

# **Die Bedeutung von Cofilin1 und Aktindynamik für die Funktion von T-Zellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Julia Kristin Hecker**

aus Bonn

Bonn, im März 2015

---

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt

**Gutachter:**

Erstgutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Willecke

Tag der Promotion: 18.06.2015

Erscheinungsjahr: 2015

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe angefertigt wurde. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Universität als Dissertation eingereicht wurde.

Bonn im März 2015

---

Julia Hecker

# Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Aktin depolymerisierenden Faktors Cofilin1 und der Aktindynamik für die Funktion von T-Zellen näher untersucht.

Der vollständige Knock-out des Cofilin1-Proteins führt zu früher embryonaler Letalität, sodass diese Problematik für die Untersuchungen umgangen werden musste. Dies erfolgte über einen molekulargenetischen Ansatz durch den Einsatz verschiedener Mausmodelle. Zunächst wurde über einen Tripletaustausch im Cofilin1-Gen konstitutiv aktives bzw. inaktives Protein hergestellt, um die Auswirkungen des Aktivierungszustands von Cofilin1 auf die Aktinpolymerisation zu untersuchen. In Aktin-Assays konnte bestätigt werden, dass konstitutiv aktives Cofilin1 eine vergleichbare Aktivität gegenüber Aktin zeigt wie das WT-Protein, während die inaktive Form keinen Einfluss nimmt. Anschließend wurden diese Mutationen *in vivo* im Mausmodell bezüglich ihrer Bedeutung in T-Zellen untersucht. Sowohl T-Helferzellen als auch zytotoxische T-Zellen mit konstitutiv aktivem Cofilin1 reifen im Thymus heran und wandern in die sekundären lymphatischen Organe aus. Das inaktive Cofilin1 führt dagegen, ebenso wie der frühe Knock-out des Proteins, zu einer Blockade in der T-Zellentwicklung.

Des Weiteren wurde mittels Cofilin1-Deletion während einer späten Phase der T-Zellentwicklung die Bedeutung des Proteins in reifen T-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des Cofilin1-Proteins zwar keinen Einfluss auf die T-Zellreifung hat, aber die T-Zellen nur zu einem kleinen Teil aus dem Thymus emigrieren können. Analysen von T-Zellen aus den sekundären lymphatischen Organen, wie Lymphknoten und Milz, machten eine starke Reduktion von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Defizienz in diesen Organen deutlich. Diese Zellen weisen ein erhöhtes Vorkommen von Apoptose auf. Das Fehlen von Cofilin1-defizienten T-Zellen ist vermutlich auf Migrations- und Adhäsionsdefekte zurückzuführen. Detaillierte Untersuchungen bezüglich der Aktivierbarkeit von zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Knock-out konnten belegen, dass sie hinsichtlich dieses Aspekts einen Defekt aufweisen.

Weiterhin stellte die Aptamer-Technologie einen zweiten Ansatz zur spezifischen Regulation der Cofilin1-Aktivität dar. Es konnte erfolgreich ein RNA-Aptamer selektiert werden, welches eine Affinität für Cofilin1 besitzt.

## Abstract

In this work the role of the actin depolymerizing factor Cofilin1 and actin dynamics concerning their function in T-cells were examined.

The complete knock-out of Cofilin1 protein leads to early embryonic lethality, so that this problem has to be overcome for the following investigations. Therefore a genetic approach using different mouse models was employed. Firstly two mutations leading to a triplet exchange in the Cofilin1 gene resulting in constitutive active and inactive protein were used, allowing the analysis of the relevance of the activation stage of the Cofilin1 protein for actin polymerization. It could be confirmed in *in vitro* assays that constitutive Cofilin1 showed comparable activity as the wildtype protein regarding actin, while the inactive form had no influence. Afterwards these mutations were investigated in mouse models concerning their relevance in T-cells. T-helper cells as well as cytotoxic T-cells with constitutive active Cofilin1 showed normal maturation in the thymus and migrated into secondary lymphatic organs. In contrast inactive Cofilin1 leads to a severe maturation block during early T-cell maturation, comparable the early knock-out of this protein.

Furthermore by Cofilin1 deletion in a late phase of T-cell development the role of this protein in mature T-cells was examined. It was shown that the deletion has no impact on T-cell maturation, but only a small amount of these T-cells was able to emigrate out of the thymus. Analysis of T-cells of secondary lymphatic organs, like lymph nodes and spleen, revealed a reduced amount of T-helper cells and cytotoxic T-cells in these organs. These cells showed elevated apoptosis. The absence of Cofilin1 deficient T-cells could presumably be explained by migration and adhesion defects of these cells. Detailed analysis concerning activation of cytotoxic T-cells with Cofilin1-knock-out could show that they have defects regarding this aspect.

In addition the aptamer-technology represents another approach for modulating Cofilin1-activity concerning actin dynamics. An RNA-aptamer with affinity for Cofilin1 was successfully selected.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Das Immunsystem .....	1
1.1.1. Angeborene und erworbene Immunität .....	1
1.1.2. T-Zellen .....	2
1.1.2.1. T-Zellreifung .....	2
1.1.2.2. Aktivierung von naiven T-Zellen und Bildung der immunologischen Synapse .....	4
1.2. Das Zytoskelett .....	6
1.2.1. Aktin .....	6
1.2.1.1. Aktinpolymerisation .....	7
1.2.1.2. Kinetik der Aktinpolymerisation <i>in vitro</i> .....	9
1.2.2. Aktin-bindende Proteine .....	10
1.2.2.1. Die ADF/Cofilin-Proteinfamilie .....	12
1.2.2.2. Cofilin1 .....	13
1.2.2.3. Bedeutung von Cofilin1 für das Immunsystem .....	15
1.3. Methoden zur Regulation der Proteinexpression <i>in vivo</i> .....	18
1.3.1. Konditionale Regulation der Genexpression in der Maus – Das Cre/loxP- System .....	18
1.3.1.1. Induzierbare Deletion eines Gens – Tamoxifen-Induktion der Cre- Rekombinase .....	19
1.3.2. Aptamere als molekulare Werkzeuge .....	20
1.4. Zielsetzung der Arbeit .....	24
2. Material .....	25
2.1. Lösungen, Puffer und Medien .....	25
2.1.1. Allgemein .....	25
2.1.2. Molekularbiologie .....	25
2.1.2.1. Nukleinsäureanalytik .....	25
2.1.2.2. Bakterienkultur .....	28
2.1.3. Biochemie .....	29
2.1.4. Zellbiologie .....	33

2.1.5.	Aptamer-Selektion .....	33
2.1.6.	Wichtige kommerzielle Lösungen und Reagenzien .....	34
2.2.	Kommerzielle Reagenziensätze (Kits) .....	35
2.3.	Allgemeine Labormaterialien .....	35
2.4.	Geräte im Labor .....	37
2.5.	Nukleinsäuren.....	39
2.5.1.	Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion .....	39
2.5.2.	Southernblot-Hybridisierungssonden .....	40
2.5.3.	Vektoren und rekombinante Plasmide .....	40
2.6.	Antikörper .....	42
2.6.1.	Primäre Antikörper .....	42
2.6.2.	Sekundäre Antikörper .....	42
2.6.3.	FACS-Antikörper.....	42
2.6.4.	Antikörper für die Aktivierungsversuche mit T-Zellen.....	43
2.6.5.	FACS-Farbstoffe .....	43
2.7.	Mauslinien .....	44
2.8.	Bakterienstämme .....	45
2.9.	Größenstandards .....	46
2.9.1.	DNA-Größenstandards .....	46
2.9.2.	Protein-Größenstandards.....	46
2.10.	Software .....	47
3.	Methoden.....	48
3.1.	Molekularbiologische Methoden .....	48
3.1.1.	Nukleinsäureanalytik .....	48
3.1.1.1.	Isolierung genomischer DNA aus murinen Schwanzbiopsien .....	48
3.1.1.2.	Isolierung genomischer DNA aus Zellen muriner Gewebe .....	48
3.1.1.3.	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	49
3.1.1.4.	Natriumacetat-Fällung .....	49
3.1.1.5.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	49
3.1.1.5.1.	Genotypisierungs-PCRs zur Charakterisierung transgener Mäuse .....	50
3.1.1.6.	Aufreinigung und Konzentrierung von PCR-Produkten .....	55
3.1.1.7.	Agarosegel-Elektrophorese .....	55
3.1.1.8.	Elution von DNA aus Agarosegelen.....	55

3.1.1.9.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	56
3.1.1.9.1.	Mini-Präparation .....	56
3.1.1.9.2.	Midi-Präparation .....	56
3.1.1.10.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	57
3.1.1.11.	Southernblot-Analyse.....	57
3.1.2.	Techniken bei der Herstellung rekombinanter Plasmide .....	59
3.1.2.1.	Modifikation von DNA-Molekülen .....	59
3.1.2.1.1.	Spaltung doppelsträngiger Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen.....	59
3.1.2.1.2.	Dephosphorylierung von Vektorenden .....	59
3.1.2.1.3.	Ligation doppelsträngiger Nukleinsäuren.....	59
3.1.2.2.	Transformation .....	60
3.1.2.2.1.	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien .....	60
3.1.2.2.2.	Chemische Transformation.....	60
3.1.2.3.	<i>Colony</i> -PCR.....	60
3.1.2.4.	DNA-Sequenzierung .....	61
3.1.2.5.	Kryokonservierung von Bakterien.....	61
3.1.2.6.	Sonderformen bei der Herstellung rekombinanter Plasmide .....	61
3.1.2.6.1.	TA-Klonierung.....	61
3.1.2.6.2.	In-Fusion-Klonierung.....	61
3.2.	Biochemische Methoden .....	62
3.2.1.	Proteinanalytik.....	62
3.2.1.1.	Proteinextraktionen aus murinen Geweben .....	62
3.2.1.2.	Proteinextraktionen aus Zellen muriner Gewebe .....	62
3.2.1.3.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford-Assay) .....	63
3.2.1.4.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	63
3.2.1.5.	Coomassie-Färbung.....	64
3.2.1.6.	Westernblot-Analyse.....	64
3.2.1.7.	ELISA .....	65
3.2.1.8.	Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Bakterien.....	66
3.2.1.8.1.	Überexpression von Proteinen.....	66



3.2.1.8.2.	Aufreinigung von Proteinen mittels GST-Tag .....	67
3.2.1.8.3.	Aufreinigung des Proteins mittels Strep-Tag .....	68
3.2.1.9.	Aufkonzentrierung von Proteinen .....	68
3.2.2.	Aufreinigung von Aktin und biochemische Assays mit Aktin .....	69
3.2.2.1.	Gewinnung von G-Aktin aus Aktin-Aceton-Puder .....	69
3.2.2.2.	Aktin-Assays .....	70
3.2.2.2.1.	Aktin-Pelleting-Assay .....	70
3.2.2.2.2.	Pyren-Aktin-Assay .....	70
3.2.2.2.2.1.	Markierung von Aktin mit Pyren .....	71
3.2.2.2.2.2.	Polymerisations-Assay .....	71
3.2.2.2.2.3.	Depolymerisations-Assay .....	72
3.2.2.2.3.	Falling-Ball-Assay .....	72
3.3.	Zellbiologische Methoden .....	72
3.3.1.	Isolierung von Zellen aus lymphatischen Organen der Maus .....	72
3.3.2.	Isolierung von Immunzellen aus murinem Blut .....	73
3.3.2.1.	Lyse von Erythrozyten .....	73
3.3.3.	Durchflusszytometrische Untersuchung von Zellen .....	74
3.3.3.1.	Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung von Zellen .....	75
3.3.3.2.	Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung von Zellen .....	75
3.3.3.3.	Verwendung von <i>Counting-Beads</i> zur Zellzahlbestimmung im Durchflusszytometer .....	75
3.3.4.	Apoptose-Assay .....	76
3.3.5.	Zellseparation .....	76
3.3.5.1.	Zellseparation mit Hilfe magnetischer Antikörper (MACS) .....	76
3.3.5.2.	Zell-Sorting (FACS) .....	77
3.3.6.	Kultivierung primärer T-Zellen der Maus .....	77
3.3.7.	Aktivierung von T-Zellen .....	78
3.4.	Haltungs- und Zuchtbedingungen von Mäusen .....	78
3.5.	Methoden zur Selektion eines Aptamers .....	78
3.5.1.	SELEX .....	78
3.5.1.1.	Kopplung des Zielmoleküls an magnetische <i>Beads</i> .....	78
3.5.1.2.	Selektion .....	79
3.5.1.3.	Separation .....	79

3.5.1.4. Amplifikation.....	80
3.5.2. Filterbindungsassay.....	81
3.6. Statistische Auswertung.....	83
4. Ergebnisse .....	84
4.1. Untersuchungen zur Cofilin1-Aktivität <i>in vitro</i> .....	84
4.1.1. Ein Tripletaustausch im Exon2 des Cofilin1-Gens führt zu konstitutiv aktivem bzw. inaktivem Protein .....	84
4.1.1.1. Aufreinigung von Aktin und rekombinanten Cofilin1-Proteinen.....	85
4.1.1.1.1. Aktinaufreinigung .....	85
4.1.1.1.1. Cofilin1-Aufreinigung.....	87
4.1.1.2. Bindungsstudien mit Hilfe des Aktin- <i>Pelleting</i> -Assays.....	88
4.1.1.3. Aktivitätsstudien mit Hilfe des Pyren-Aktin-Assays .....	90
4.1.1.3.1. Vorversuche zu den Pyren-Aktin-Assays .....	90
4.1.1.3.1.1. Pyrenaktin-Anteil .....	90
4.1.1.3.1.2. Latrunculin-Konzentration .....	91
4.1.1.3.2. Polymerisations-Assay .....	92
4.1.1.3.3. Depolymerisations-Assay.....	94
4.2. Die ADF/Cofilin-Familie in Thymozyten und T-Zellen .....	95
4.3. Bedeutung von Cofilin1 für T-Zellen <i>in vivo</i> .....	96
4.3.1. Cofilin1-Deletion während der T-Zell-Entwicklung mit Hilfe der CD4-Cre- und der distalLck-Cre-Mauslinie .....	96
4.3.1.1. Rosy-Reportermaus-Untersuchungen belegen die Aktivität der verwendeten-Cre-Rekombinasen .....	98
4.3.2. Bedeutung der Cofilin1-Aktivität für T-Zellen .....	101
4.3.2.1. Nachweis der Mutationen im Cofilin1-Gen auf DNA-Ebene .....	101
4.3.2.2. Nachweis der Mutationen auf Protein-Ebene .....	102
4.3.2.3. Für die T-Zellreifung ist konstitutiv aktives Cofilin1 essentiell .....	103
4.3.2.4. Reife T-Zellen mit konstitutiv aktivem Cofilin1 emigrieren aus dem Thymus in das periphere lymphatische System .....	105
4.3.2.5. In Thymozyten und reifen T-Zellen mit konstitutiv aktivem Cofilin1 ist der F-Aktinlevel erhöht.....	106
4.3.3. Die T-Zellreifung nach Ausschalten von Cofilin1 in einer späten Phase der T-Zell-Entwicklung.....	108

4.3.3.1.	Thymozyten mit Cofilin1-Deletion reifen zu einfach positiven Zellen heran .....	108
4.3.3.2.	Überprüfung der Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase in einfach positiven Thymozyten auf DNA- und Protein-Ebene.....	109
4.3.3.3.	Entwicklungsspezifische Marker belegen eine unbeeinträchtigte Reifung von Thymozyten mit Cofilin1-Deletion.....	111
4.3.3.4.	Thymozyten mit Cofilin1-Deletion zeigen keine erhöhte Apoptose.....	113
4.3.3.5.	Thymozyten mit Cofilin1-Deletion enthalten mehr F-Aktin.....	114
4.3.3.6.	Das Vorkommen von <i>pre-Recent Thymic Emigrants</i> mit Cofilin1-Deletion ist erhöht .....	115
4.3.4.	Auswirkungen des Ausschaltens von Cofilin1 in peripheren T-Zellen.....	116
4.3.4.1.	Bei einer Cofilin1-Deletion ist die Anzahl von T-Zellen in Lymphknoten, Milz und Blut verringert .....	117
4.3.4.2.	Bestätigung der Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase in T-Zellen aus der Milz auf Protein-Ebene .....	119
4.3.4.3.	T-Zellen mit Cofilin1-Deletion weisen ein erhöhtes Vorkommen von Apoptose auf.....	120
4.3.4.4.	In T-Zellen mit Cofilin1-Deletion ist der F-Aktinlevel deutlich erhöht .....	121
4.3.5.	Zytotoxische T-Zellen mit Cofilin1-Deletion sind bezüglich ihrer Aktivierbarkeit verändert .....	124
4.3.5.1.	Zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion sind nach Aktivierung bei der Proliferation beeinträchtigt .....	124
4.3.5.2.	Die Expression früher Aktivierungsmarker in zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion ist verändert .....	126
4.3.5.3.	Eine Cofilin1-Deletion führt zu einem verminderten Vorhandensein von naiven zytotoxischen T-Zellen .....	128
4.4.	Cofilin1-Deletion in peripheren T-Zellen <i>in vitro</i> .....	130
4.4.1.	Etablierung der Bedingungen zur Tamoxifen-induzierbaren CreER <sup>T2</sup> -Rekombinase in T-Zellen mit Hilfe der Rosy-Reportermaus .....	130
4.4.2.	Die Tamoxifen-Induktion der Cofilin1-Deletion in peripheren T-Zellen <i>in vitro</i> führt zur Rekombination auf DNA-Ebene .....	133
4.4.3.	Trotz Tamoxifen-induzierbarer Cofilin1-Deletion in peripheren T-Zellen ist noch Cofilin1-Protein vorhanden.....	134
4.5.	Selektion eines RNA-Aptamers gegen Cofilin1.....	135
4.5.1.	Vorbereitungen für die Aptamer-Selektion gegen Cofilin1 .....	136
4.5.1.1.	Aufreinigung von rekombinantem Cofilin1-Strep-Tag-Protein .....	136

4.5.1.2.	Immobilisierung von rekombinatem Cofilin1-Strep- <i>Tag</i> -Protein.....	137
4.5.1.3.	Auswahl der SELEX-Bibliothek .....	138
4.5.2.	Durch SELEX erfolgt eine Anreicherung von potentiellen Cofilin1-Aptamersequenzen .....	138
4.5.3.	Die Überprüfung der Monoklone liefert eine bindende Sequenz.....	139
4.5.3.1.	K <sub>D</sub> -Wert-Bestimmung des potentiellen Cofilin1-Aptamers.....	140
4.5.3.2.	Untersuchung der Spezifität des potentiellen Cofilin1-Aptamers.....	141
4.5.4.	Untersuchung der Auswirkung der Aptamer-Sequenz auf Cofilin1 mittels Aktin-Assays.....	142
4.5.4.1.	Das Cofilin1-Aptamer im Aktin- <i>Pelleting</i> -Assay.....	142
4.5.4.2.	Das Cofilin1-Aptamer im <i>Falling-Ball</i> -Assay .....	144
4.5.5.	Re-SELEX zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität der gefundenen Aptamer-Sequenz .....	145
5.	Diskussion.....	149
5.1.	Die Rolle des Phosphorylierungsstatus für die Cofilin1-Aktivität <i>in vitro</i> .....	150
5.2.	Die Bedeutung von Cofilin1 für T-Zellen <i>in vivo</i> .....	154
5.2.1.	Ist der Phosphorylierungsstatus von Cofilin1 für Thymozyten und T-Zellen von Bedeutung? .....	155
5.2.2.	Hat das Ausschalten von Cofilin1 in einer späten Phase der T-Zellreifung einen Einfluss auf die Entwicklung von T-Zellen? .....	158
5.2.3.	Welche Rolle spielt Cofilin1 für reife T-Zellen im peripheren lymphatischen System?.....	162
5.2.4.	Hat der Cofilin1-KO in zytotoxischen T-Zellen einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit dieser Zellen? .....	165
5.3.	Die Halbwertszeit von Cofilin1 in peripheren T-Zellen <i>in vitro</i> .....	167
5.4.	Das Cofilin1-Aptamer .....	168
6.	Literatur .....	I
7.	Anhang .....	XV
7.1.	Vektorkarten.....	XV

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der immunologischen Synapse.....	5
Abbildung 1.2: Modelle eines Aktinmonomers. ....	7
Abbildung 1.3: Die zwei Phasen der Aktinpolymerisation. ....	8
Abbildung 1.4: Zeitlicher Verlauf der Aktinpolymerisation <i>in vitro</i> . ....	9
Abbildung 1.5: Das Aktinskelett in der Zelle wird durch verschiedene Proteine reguliert. ....	12
Abbildung 1.6: Regulation der Cofilin1-Aktivität über Phosphorylierung.....	14
Abbildung 1.7: Regulationsstellen von Cofilin1. ....	15
Abbildung 1.8: Cofilin1 spielt eine Rolle bei der Bildung der immunologischen Synapse. ....	16
Abbildung 1.9: Die Aktivität der Cre-Rekombinase des CreER-Fusionproteins ist durch Tamoxifen induzierbar.....	20
Abbildung 1.10: Bindung eines Aptamers an sein Zielmolekül. ....	20
Abbildung 1.11: Schematischer Ablauf einer SELEX-Runde. ....	21
Abbildung 3.1: Exemplarisches Lymphozyten- <i>Gate</i> und Einzelfärbungen für CD4- und CD8-positive Zellen. ....	74
Abbildung 4.1: Der Tripletaustausch im Exon 2 des Cofilin1-Gens führt zu konstitutiv aktivem bzw. inaktivem Cofilin1. ....	85
Abbildung 4.2: Aufreinigung von Aktin aus Aktin-Aceton-Puder.....	86
Abbildung 4.3: Aufreinigung rekombinanter Cofilin1-Proteine.....	87
Abbildung 4.4: Untersuchung von Cof1-Ala- und Cof1-Asp- im Vergleich zu Cof1-WT- Protein im Aktin- <i>Pelleting</i> -Assay.....	89
Abbildung 4.5: Ermittlung des optimalen Pyren-Aktin-Anteils.....	91
Abbildung 4.6: Ermittlung der idealen Latrunculin B-Konzentration.....	92
Abbildung 4.7: Untersuchung von Cof1-Ala- und Cof1-Asp- im Vergleich zu Cof1-WT- Protein im Pyren-Aktin-Polymerisationsassay.....	93
Abbildung 4.8: Untersuchung von Cof1-Ala- im Vergleich zu Cof1-WT-Protein im Pyren- Aktin-Depolymerisationsassay.....	94
Abbildung 4.9: Expression der ADF/Cofilin-Proteinfamilie in lymphatischen Organen.....	96
Abbildung 4.10: Rekombinationsschema des konditionalen Cofilin1-Mausmodells. ....	97
Abbildung 4.11: Cre-vermittelte Deletion zu verschiedenen Phasen der T-Zellreifung im Thymus.....	98

Abbildung 4.12: Vergleich der Aktivität der CD4- und der dLck-Cre-Rekombinase in Thymozyten mit Hilfe der Rosy-Reportermaus.....	99
Abbildung 4.13: Untersuchung der Aktivität der dLck-Cre-Rekombinase in peripheren T-Zellen mittels der Rosy-Reportermaus.....	100
Abbildung 4.14: Southernblot-Analyse zur Untersuchung der Deletion in der konstitutiv aktiven und inaktiven Cof1-Mutante. ....	102
Abbildung 4.15: Westernblot-Analyse zur Untersuchung der Deletion in der konstitutiv aktiven und inaktiven Cof1-Mutante. ....	103
Abbildung 4.16: Durchflusszytometrische Untersuchung von Thymozyten in der konstitutiv aktiven und inaktiven Cof1-Mutante.....	105
Abbildung 4.17: Analyse von CD4- und CD8-positiven Zellen im Thymus und in den peripheren lymphatischen Organen der Ala-Mutante.....	106
Abbildung 4.18: Untersuchung des Aktinstatus im Thymus und in den peripheren lymphatischen Organen der Ala-Mutante.....	107
Abbildung 4.19: Durchflusszytometrische Untersuchung von einfach positiven Thymozyten mit Cofilin1-Deletion vermittelt durch die dLck-Cre-Rekombinase.....	109
Abbildung 4.20: Southernblot- und Westernblot-Analyse Thymozyten mit Cofilin1-Deletion vermittelt durch die dLck-Cre-Rekombinase.....	110
Abbildung 4.21: Expressionsanalyse verschiedener Marker während einzelner Phasen der Reifung von Thymozyten mit Cofilin1-Deletion vermittelt durch die dLck-Cre-Rekombinase.....	112
Abbildung 4.22: Untersuchung des Apoptosestatus in Thymozyten mit dLck-Cre-Rekombinase vermittelter Cofilin1-Deletion.....	113
Abbildung 4.23: Untersuchung des Aktinstatus in Thymozyten mit dLck-Cre-Rekombinase vermittelter Cofilin1-Deletion.....	114
Abbildung 4.24: Expression der beiden Entwicklungsmarker CD24 und Qa2 in <i>pre-Recent Thymic Emigrants</i> mit dLck-Cre-Rekombinase vermittelter Cofilin1-Deletion.....	116
Abbildung 4.25: Durchflusszytometrische Untersuchung von peripheren T-Zellen mit Cofilin1-Deletion mittels der dLck-Cre-Rekombinase.....	118
Abbildung 4.26: Westernblot-Analyse der Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase in T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen aus der Milz.....	120

Abbildung 4.27: Untersuchung des Apoptosestatus in T-Zellen mit dLck-Cre-Rekombinase vermittelter Cofilin1-Deletion. ....	121
Abbildung 4.28: Untersuchung des Aktinstatus in peripheren T-Zellen mit Cofilin1-Deletion vermittelt durch die dLck-Cre-Rekombinase. ....	123
Abbildung 4.29: Proliferationsanalyse von zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase. ....	125
Abbildung 4.30: Expression früher Aktivierungsmarker in zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase. ....	127
Abbildung 4.31: Expression der Marker CD62L und CD44 in zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase. ....	129
Abbildung 4.32: Etablierung der Bedingungen zur Tamoxifen-Induktion der CRER <sup>T2</sup> -Rekombinase in T-Zellen. ....	132
Abbildung 4.33: Southernblot-Analyse der Tamoxifen-induzierbaren Cofilin1-Deletion in T-Zellen <i>in vitro</i> . ....	134
Abbildung 4.34: Westernblot-Analyse der Tamoxifen-induzierbaren Cofilin1-Deletion in T-Zellen <i>in vitro</i> . ....	135
Abbildung 4.35: Aufreinigung von rekombinantem Cofilin1-Strep-Tag-Protein. ....	137
Abbildung 4.36: Schematische Darstellung der DNA-Sequenz der A50-Bibliothek. ....	138
Abbildung 4.37: Untersuchung der einzelnen SELEX-Runden im Filterbindungsassay auf die Anreicherung bindender Sequenzen. ....	139
Abbildung 4.38: Untersuchung von Klon 1 im Filterbindungsassay auf Bindungsaffinität für das Zielprotein Cofilin1. ....	140
Abbildung 4.39: Bestimmung des KD-Werts des potentiellen Cofilin1-Aptamers. ....	141
Abbildung 4.40: Spezifität des potentiellen Cofilin1-Aptamers. ....	142
Abbildung 4.41: Untersuchung der Auswirkungen des Cofilin1-Aptamers auf Cofilin1 im Aktin-Pelleting-Assay. ....	143
Abbildung 4.42: Untersuchung der Auswirkungen des Cofilin1-Aptamers auf Cofilin1 im Falling-Ball-Assay. ....	144
Abbildung 4.43: Untersuchung der drei potentiellen Klone der Re-SELEX im Filterbindungsassay. ....	147

## Abkürzungsverzeichnis

%	von hundert	engl.	englisch
°	Grad	EP	einfach positiv
°C	Grad Celsius	ER	Estrogenrezeptor
μ	micro	et al.	<i>et altera</i> = und andere
ADF	<i>Actin Depolymerising Factor</i>	etc.	<i>et cetera</i> = und so weiter
ADP	Adenosindiphosphat	FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
Ala	Alanin	F-Aktin	filamentöses Aktin
Amp	Ampizillin	FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
APC	Allophycocyanin	FITC	Fluoresceiniso-thiocyanat
APS	Ammoniumpersulfat	fl	gefloxt
APZ	Antigen	g	Gramm
	präsentierende Zelle	G-Aktin	globuläres Aktin
Asp	Aspartat	GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat	griech.	griechisch
bp	Basenpaare	GST	Glutathion-S-Transferase
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>	GTP	Guanosintriphosphat
BV	<i>Brilliant Violet</i>	h	Stunde
bzw.	beziehungsweise	HABA	<i>2-[4'-hydroxybenzeneazo]benzoic acid</i>
c	centi	HEPES	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i>
ca.	circa		
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	hi	<i>high</i>
Cof	Cofilin	Ig	Immunglobulin
Cre	<i>cause recombination</i>	IL-2	Interleukin-2
C-Terminus	Carboxyterminus	int	<i>intermediate</i>
Cy	Cyanin	IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
Da	Dalton	k	kilo
del	deletiert	K <sub>D</sub> -Wert	Dissoziationskonstante
dLck	<i>distal lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>	KO	Knock-out
DN	doppelt negativ	l	Liter
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	lat.	lateinisch
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	LB	Luria Bertani
DP	doppelt positiv	loxP	<i>locus of crossing (X) over P1</i>
DTT	Dithiothreitol	M	Molar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	m	Meter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	m	milli
EGTA	Ethylenglycol-N,N',N'-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure	MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
		MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>



MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>	s	Sekunde
min	Minute	Σ	Summe
n	Anzahl	SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
n	nano	SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
NAA	<i>Non-Essential Amino Acids</i>	SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
nt	Nukleotide	ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
N-Terminus	Aminotermius	TAE	Tris-Acetat-EDTA
NTP	Nukleosidtriphosphat	TBE	Tris-Borat-EDTA
OD	optische Dichte	TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
p	pico	TE	Tris-EDTA
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	TEMED	Tetramethylethylendiamin
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	TIRF	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i>
PE	Phycoerythrin	TK	Transkription
PEB	<i>Protein Extraction Buffer</i>	U	<i>Units</i>
PerCP	Peridinin Chlorophyll	ÜN	über Nacht
pH	<i>potential hydrogenii</i> = Stärke des Wasserstoffs	UV	ultraviolett
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)	V	Volt
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>	v/v	Volumen/Volumen
rpm	<i>Revolutions per Minute</i>	vgl.	vergleiche
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>	Vol.	Volumen
RT	Raumtemperatur	w/v	Gewicht pro Volumen
RT	Reverse Transkription	will. Einh.	willkürliche Einheiten
		WT	Wildtyp
		YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
		z.B.	zum Beispiel

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems (lat. *immunis*, „frei sein von“) besteht in erster Linie darin, den Organismus vor Infektionen, die durch eingedrungene Pathogene hervorgerufen werden, zu schützen. Weiterhin dient es auch dazu, den Körper vor körpereigenen Strukturen zu bewahren, die ihm Schaden zufügen könnten, wie beispielsweise vor bösartigen Zellen, die potentiell zur Ausbildung eines Tumors führen.

### 1.1.1. Angeborene und erworbene Immunität

Das Immunsystem kann in zwei Formen der Abwehr unterteilt werden: in eine unspezifische, angeborene und in eine spezifische, erworbene Abwehr. Die angeborene Antwort des Immunsystems besteht in der schnellen Form der Abwehrreaktion kurz nach einer Infektion. Wichtige Zellen, die zu diesem Teil des Immunsystems gehören, sind die phagozytierenden Lymphozyten, wie Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen. Diese Zellen nehmen eingedrungene Pathogene über Phagozytose auf und können als Antigen präsentierende Zellen pathogene Strukturen auf ihrer Oberfläche darbieten. Die präsentierten pathogenen Strukturen werden dann wiederum von Zellen erkannt, die Teil der spezifischen Immunantwort sind.

Die erworbene Antwort des Immunsystems stellt die langsame Form der Abwehrreaktion dar, die sich im Laufe des Lebens eines Organismus fortwährend spezifiziert, wobei es zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses kommt, um bei einem Zweitkontakt mit einem Antigen wirkungsvoller und schneller reagieren zu können. Die Effektorzellen der erworbenen Immunität sind die B- und T-Zellen. Die B-Zellen vermitteln die humorale Immunantwort, wobei diese nach Kontakt mit einem Antigen, Antikörper produzieren. Die T-Zellen vermitteln dagegen die zellgebundene Immunität. (NEUMANN, 2008; MURPHY et al., 2014)

## 1.1.2. T-Zellen

### 1.1.2.1. T-Zellreifung

Die Entwicklung der T-Zellen erfolgt im Thymus. Diesen erreichen die Zellen im sogenannten Vorläuferstadium. Diese Zellen haben sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet.

Die Reifung dieser Thymozyten verläuft zunächst über vier Stadien, die aufgrund des Fehlens der beiden Co-Rezeptoren CD4 und CD8 als doppelt negativ (DN) bezeichnet werden und noch keinen vollständigen T-Zellrezeptor exprimieren. Die Unterteilung in diese vier Stadien (DN1-DN4) erfolgt aufgrund der Expression der Marker CD44, CD25 und c-Kit. CD44 und CD25 werden dabei wie folgt exprimiert: DN1  $CD44^+CD25^-$ , DN2  $CD44^+CD25^+$ , DN3  $CD44^-CD25^+$ , DN4  $CD44^-CD25^-$ . (GODFREY et al., 1993) Im nächsten Reifungsschritt exprimieren die Thymozyten sowohl einen reifen T-Zellrezeptorkomplex aus TCR ( $\alpha:\beta$ ,  $\gamma:\delta$ ) und CD3 ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ) als auch die beiden Co-Rezeptoren des T-Zellrezeptors, CD4 und CD8, weshalb man sie nun als doppelt positive (DP) Thymozyten bezeichnet. Der T-Zellrezeptorkomplex, der für die Antigenerkennung verantwortlich ist, ist ein Heterodimer, das überwiegend aus der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit besteht. Eine kleine Minderheit der T-Zellrezeptoren besteht aus den Untereinheiten  $\gamma$  und  $\delta$ , welche sehr wahrscheinlich andere Antigenerkennungseigenschaften besitzen. Ihre Funktion im Immunsystem ist aber noch nicht genau geklärt. Der T-Zellrezeptor allein kann nach Antigenbindung kein Signal ins Zellinnere schicken. Dazu benötigt er den CD3-Komplex, der aus den Untereinheiten  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$ , zur Signalgebung aufgebaut ist.

Die doppelt positiven Thymozyten durchlaufen nun die positive Selektion. Dieser Selektionsschritt dient dazu, dass nur solche Zellen weiter heranreifen, die in der Lage sind, mit ihrem T-Zellrezeptor körpereigene Haupthistokompatibilitäts-Komplexe (MHC, engl. *Major Histocompatibility Complex*) zu erkennen. Die Haupthistokompatibilitäts-Komplexe sind Marker, die die Zellen als Selbst markieren und die Antigene präsentieren. Man unterscheidet MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Moleküle. Während die ersteren auf nahezu allen Zellen exprimiert sind, beschränkt sich die Expression der letzteren nur auf eine kleine Anzahl von Zellen des Immunsystems, die Antigen präsentierenden Zellen, wie z.B. Makrophagen. Positiv selektierte Thymozyten stellen die Expression einer der beiden Co-Rezeptoren des T-Zellrezeptors ein. Solche Thymozyten, die eine positive Selektion für MHC-I

erhalten haben, stellen die Expression des CD4-Rezeptors ein und werden somit zu CD8-positiven Thymozyten. Wohingegen solche, die eine positive Selektion für MHC-II erhalten haben, die CD8-Rezeptorexpression einstellen und daher als CD4-positive Thymozyten bezeichnet werden. Somit haben die Thymozyten nun das einfach positive Stadium (EP) erreicht.

Nun folgt der zweite Selektionsschritt, die negative Selektion, die dazu dient alle Thymozyten zu eliminieren, die körpereigene Antigene erkennen können und somit autoreaktiv sind.

Thymozyten, die sowohl die positive als auch die negative Selektion erfolgreich passiert haben, verlassen den Thymus als reife, naive T-Zellen. Die Selektionsschritte führen zu einem vermehrten Auftreten von Apoptose im Thymus. 98 % aller Thymozyten, die sich im Thymus entwickeln, sterben durch programmierten Zelltod.

T-Zellen, die in die Peripherie auswandern, lassen sich anhand der Expression der beiden Co-Rezeptoren CD4 und CD8 in zwei Typen einteilen. Die CD4-T-Zellen werden auch als T-Helferzellen bezeichnet und erkennen Antigene, die an MHC-II gebunden sind. Sie stimulieren B-Zellen und sorgen dafür, dass diese als Reaktion auf einen Antigen-Kontakt Antikörper produzieren. Die CD8-T-Zellen werden dagegen auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet und erkennen Antigene, die an MHC-I gebunden sind. Diese Zellen töten ihre Zielzelle durch Apoptose. (CAMPBELL, REECE, 2006; NEUMANN, 2008; MURPHY et al., 2014)

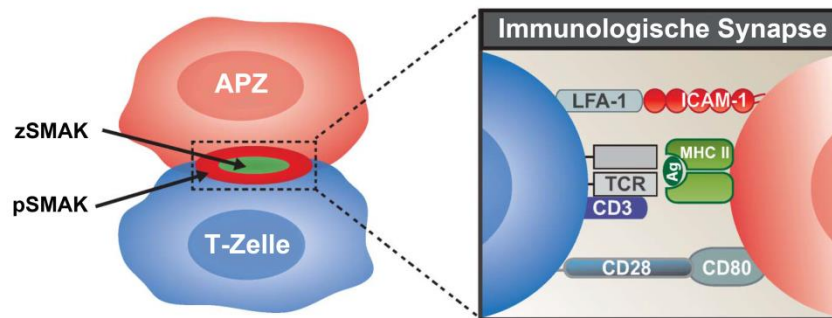
Die letzten Schritte der T-Zellreifung ereignen sich in den peripheren lymphatischen Organen, wie Lymphknoten und Milz. T-Zellen, die ihre Entwicklung im Thymus abgeschlossen haben und in das periphere lymphatische System ausgewandert sind, bezeichnet man als *Recent Thymic Emigrants*. Sie sind insbesondere durch die Expression der beiden Marker CD24 und Qa2 identifizierbar. CD24 ist der Entwicklungsmarker für Thymozyten, der ab der positiven Selektion exprimiert wird. Zum Zeitpunkt der Emigration der T-Zellen aus dem Thymus ist die CD24-Expression hoch und die von Qa2 niedrig. Nach einer Reifungszeit von ca. 3 Wochen kehrt sich die Expression der beiden Marker um und aus den *Recent Thymic Emigrants* sind naive T-Zellen geworden. Diese *post-Thymus-Entwicklung* ist derzeit noch Gegenstand aktueller Forschung. (FINK, HENDRICKS, 2011; FINK, 2013)

Die naiven T-Zellen wandern über das Blut in die peripheren lymphatischen Organe aus. Sie zirkulieren zwischen Blut, Lymphflüssigkeit und den lymphatischen Organen bis sie in Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen treten. Der Verbleib der T-Zellen in lymphatischen Organen wird als *Homing* bezeichnet und über bestimmte Rezeptoren reguliert (BUTCHER,

PICKER, 1996). Die Expression des *Homing*-Rezeptors CD62L ist für einen Verbleib der T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen verantwortlich und muss bei einer Aktivierung der Zelle entfernt werden, sodass diese in das Gewebe einwandern kann. Die Expression von CD44 ermöglicht hingegen den T-Zellen ein Einwandern ins Gewebe. Naive T-Zellen sind somit durch eine starke CD62L-Expression und eine niedrige Expression von CD44 gekennzeichnet. T-Zellen die dagegen bereits in Kontakt mit einem Antigen standen und bei erneutem Kontakt mit diesem eine schnellere, effektivere Immunantwort auslösen, bezeichnet man als Gedächtniszellen. Sie sind an ihrer starken CD44-Expression zu erkennen, während sie CD62L kaum exprimieren. Man differenziert zwischen zentralen Gedächtniszellen ( $CD44^+CD62L^+$ ) und Effektorgedächtniszellen ( $CD44^+CD62L^-$ ). Die beiden Gedächtniszelltypen unterscheiden sich in der Geschwindigkeit, mit der sie auf eine erneute Stimulation durch ihr Antigen reagieren können. Effektorgedächtniszellen können schneller reagieren und sind sehr wahrscheinlich auf einen raschen Eintritt in entzündete Gewebe spezialisiert. (MURPHY et al., 2014)

#### 1.1.2.2. Aktivierung von naiven T-Zellen und Bildung der immunologischen Synapse

T-Zellen patrouillieren durch den Organismus auf der Suche nach eingedrungenen Pathogenen. Haben sie das zu ihrem T-Zellrezeptor spezifische Antigen, gebunden an ein MHC-Protein, auf einer Antigen präsentierenden Zelle gefunden und werden darüber hinaus Signale, unter anderem über CD3 und CD28, ein Co-Rezeptor des T-Zellrezeptors, vermittelt, bildet sich eine sehr enge Kontaktzone aus. Diese Berührungsfläche zwischen T-Zelle und Antigen präsentierender Zelle wird als supramolekularer Adhäsionskomplex oder auch als immunologische Synapse bezeichnet (HUPPA, DAVIS, 2003). Diese komplexe Struktur besteht aus einem inneren Aktivierungsbereich (zentraler supramolekularer Adhäsionskomplex = zSMAK), welcher überwiegend die Signalproteine beinhaltet, die bei der T-Zellaktivierung eine Rolle spielen. Diese Region wird von dem äußeren Aktivierungsbereich umgeben (peripherer supramolekularer Adhäsionskomplex = pSMAK), der insbesondere das Integrin LFA-1 enthält, welches als Adhäsionsmolekül fungiert. (MONKS et al., 1998; GRAKOU et al., 1999; TORRES et al., 2013) Diese Struktur wird auch als *Bull's Eye* beschrieben und ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der immunologischen Synapse.** Die Kontaktstelle zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle (APZ) wird als immunologische Synapse bezeichnet. Sie weist aufgrund der Umstrukturierung von Membranproteinen eine bestimmte Struktur auf, die sich in einen inneren (zSMAK) und einen äußeren Aktivierungsbereich (pSMAK) gliedert. Im inneren Aktivierungsbereich bindet der T-Zellrezeptorkomplex, bestehend aus TCR und CD3, an ein MHC-II-gebundenes Antigen. Der Co-Rezeptor CD28 bindet an sein Antigen CD80. Im äußeren Aktivierungsbereich bindet das Adhäsionsmolekül LFA-1 an ICAM-1. (modifiziert nach (TORRES et al., 2013))

Die Bildung der immunologischen Synapse führt zur Aktivierung der T-Zellen (BABBITT et al., 2005), die sich unter anderem durch Proliferation, Expression bestimmter Aktivierungsmarker sowie Ausschüttung von Cytokinen und Synthese neuer Proteine äußert (MURPHY et al., 2014). Bei diesen Prozessen spielt das Aktinzytoskelett eine bedeutende Rolle. Die Bindung des Antigens an den T-Zellrezeptor liefert der Zelle ein Stoppsignal (DUSTIN et al., 1997), sodass die Zelle aufgrund von Umlagerungen im Aktinzytoskelett von Migrations- hin zur Stopp-Morphologie wechselt (SAMSTAG et al., 2003; ANGUS, GRIFFITHS, 2013). An der Kontaktzone zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle kommt es zur Akkumulation von Aktin. Dies trägt zur Formierung und Stabilisierung der Synapse bei (BILLADEAU, BURKHARDT, 2006). Weiterhin dient das Aktinzytoskelett als Gerüst für die Rekrutierung diverser Signalproteine (DUSTIN, COOPER, 2000). Infolge der Aktivierung von T-Zellen werden sogenannte *Rafts* zur immunologischen Synapse transportiert, woran Aktin ebenfalls beteiligt ist (HARDER, SIMONS, 1999). *Rafts* sind spezielle Mikrodomänen, die sich in der Lipidzusammensetzung von der Plasmamembran unterscheiden und konzentriert Signalkomplexe beinhalten.

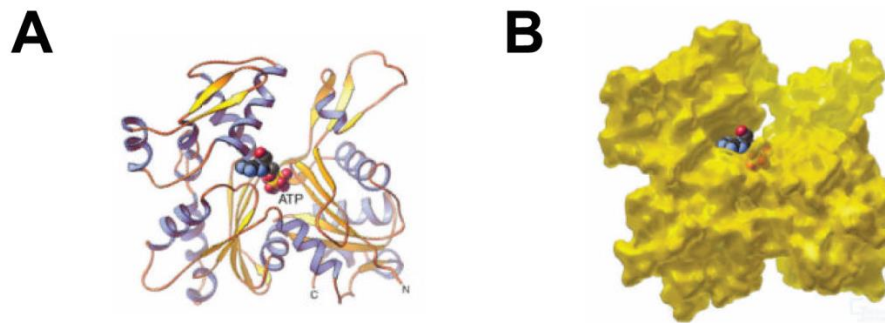
## 1.2. Das Zytoskelett

Das Zytoskelett beschreibt ein komplexes Filamentsystem im Zytoplasma jeder eukaryotischen Zelle, welches eine Vielzahl von Aufgaben erfüllt. Es ist unter anderem an der Formgebung und Plastizität der Zelle beteiligt, spielt eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und ist unerlässlich für den Transport diverser Komponenten innerhalb der Zelle.

Es gibt drei Filamenttypen, die für die Dynamik von Zellen verantwortlich sind. Die Mikrotubuli bilden ein Netzwerk für den intrazellulären Transport und leiten die Organellen. Die Intermediärfilamente sind aufgrund ihrer starken Zugfestigkeit insbesondere an der Stabilisierung der Zellform beteiligt. Die Aktinfilamente haben ihre Hauptaufgabe einerseits bei der Muskelkontraktion und andererseits bei der Formgebung der Zellen, wodurch sie eine wichtige Rolle bei der Zellmigration spielen. (ALBERTS, 2011)

### 1.2.1. Aktin

Das hoch konservierte Strukturprotein Aktin ist eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in einer eukaryotischen Zelle. Es macht 1-5 % des Zell-Gesamtproteins aus und die zytosolische Konzentration liegt bei 0,5 mM. (LODISH, 2008) Die Aktingenfamilie kodiert für drei verschiedene Isoformen:  $\alpha$ -Aktin ist die Hauptaktinform im Muskel,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin kommen dagegen überwiegend in Nicht-Muskelzellen vor (GARRELS, GIBSON, 1976). Ein Aktinmolekül wird als globuläres, monomeres Aktin (G-Aktin) synthetisiert und weist ein Molekulargewicht von 42 kDa auf. Jedes Aktinmonomer besitzt eine Bindestelle für ein Nukleotid, das sich in einer tiefen Spalte im Zentrum des Moleküls befindet (OTTERBEIN et al., 2001). Bei diesem Nukleotid handelt es sich entweder um ATP oder ADP. Dieses bildet wiederum einen Komplex mit einem divalenten Magnesium-Kation. In Abbildung 1.2 sind Modelle eines Aktinmonomers dargestellt.



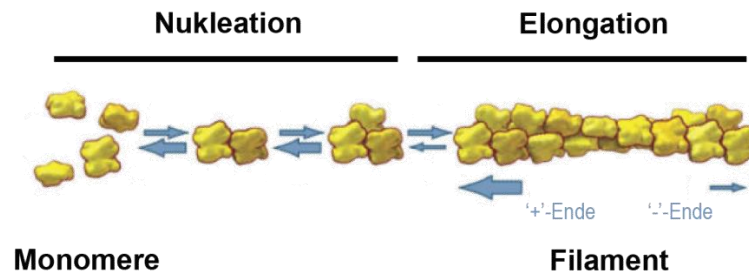
**Abbildung 1.2: Modelle eines Aktinmonomers.** (A) Ribbon-Struktur ( $\alpha$ -Helix = violett,  $\beta$ -Faltblatt = gelb) und (B) raumfüllendes Atommodell (gelb) eines G-Aktinmoleküls. In einer tiefen Spalte im Zentrum des Moleküls ist das Nukleotid ATP gebunden, das hier als Kalottenmodell dargestellt ist. (modifiziert nach (POLLARD, COOPER, 2009))

### 1.2.1.1. Aktinpolymerisation

Die Aktinmonomere lagern sich zu filamentösem Aktin (F-Aktin) zusammen, wobei eine doppelsträngige, rechtsgängige Helixstruktur entsteht, die einen Durchmesser von 7-9 nm besitzt (LODISH, 2008). Bei der Anlagerung des G-Aktins an F-Aktin sind alle Monomere aufgrund ihrer Polarität in der gleichen Richtung angeordnet, wodurch sich eine Struktur mit zwei unterschiedlichen Enden ergibt, von denen das eine als Plus- (auch engl. *barbed-end*) und das andere als Minus-Ende (auch engl. *pointed-end*) bezeichnet wird.

Durch die spontane Zusammenlagerung mehrerer G-Aktinmoleküle entstehen kurze, instabile Filamente, die sehr leicht wieder zerfallen. Für die Entstehung eines langen Filaments ist die Bildung eines Keims essentiell, ein Anfangsaggregat aus 2-3 Aktinmonomeren zwischen denen viele Kontakte bestehen. Daran können sich dann weitere G-Aktinmoleküle anlagern, sodass das Filament rasch wächst. Die Aktinpolymerisation kann demnach in die Keimbildung, auch als Nukleation bezeichnet, und die Elongation des Filaments gegliedert werden (vgl. Abbildung 1.3).





**Abbildung 1.3: Die zwei Phasen der Aktinpolymerisation.** Bei der Bildung von Aktinfilamenten müssen sich zunächst im Zuge der Nukleation 2-3 Aktinmonomere zusammenlagern, damit sich während der Elongation ein stabiles Filament ausbilden kann. F-Aktin weist eine polare Struktur mit einem Plus-Ende und einem Minus-Ende auf. (modifiziert nach (POLLARD, COOPER, 2009))

Bei der Anlagerung ans Filament wird das ATP, welches an ein G-Aktin-Molekül gebunden ist, über eine intrinsische ATPase zu ADP und Phosphat hydrolysiert, sodass im Filament überwiegend ADP-Aktin vorliegt.

Wie bereits beschrieben, unterscheiden sich die beiden Filamentenden aufgrund ihrer Polarität, wodurch es auch zu unterschiedlichen Elongationsgeschwindigkeiten an diesen kommt. Assoziation und Dissoziation von Aktinmonomeren finden zwar an beiden Enden statt, allerdings kann am Plus-Ende mit hoher Affinität ATP-Aktin gebunden werden, während am Minus-Ende bevorzugt ADP-Aktin dissoziiert, da ADP-Aktin eine geringere Bindungsstärke zu seinen Nachbarmolekülen hat. Deshalb werden diese Enden auch als schnell bzw. langsam wachsendes Ende bezeichnet.

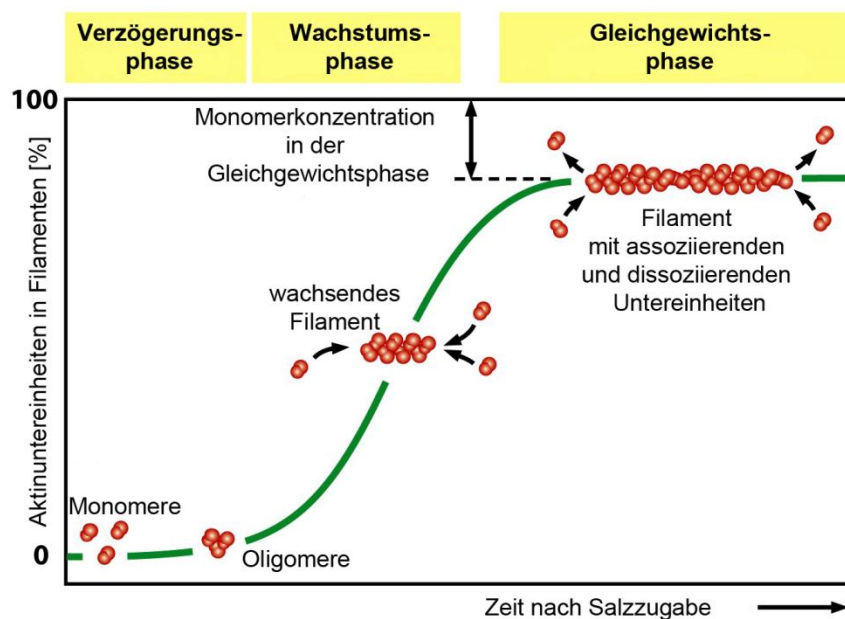
Besteht ein Gleichgewicht zwischen Assoziation (*on-rate*-Bindung) und Dissoziation (*off-rate*-Bindung), wird so viel G-Aktin angelagert, wie gleichzeitig wieder abgespalten wird. Dann liegt die sogenannte kritische Konzentration von freiem G-Aktin vor. Aufgrund der unterschiedlichen Assoziations- und Dissoziationsraten an den beiden Filamentenden sind auch die kritischen Konzentrationen verschieden. Für das schnell wachsende Plus-Ende liegt diese bei  $0,1 \mu\text{M}$  und für das langsam wachsende Minus-Ende bei  $0,6 \mu\text{M}$  Aktin (POLLARD et al., 2000). Die Polymerisation an einem Filament setzt sich so lange fort, bis die Konzentration der freien Aktinmonomere höher ist, als die kritische Konzentration am Plus-Ende, aber niedriger als die kritische Konzentration am Minus-Ende. Dann ist ein Gleichgewichtszustand erreicht, wobei am Plus-Ende mit der gleichen Geschwindigkeit Aktinmonomere angelagert, wie am Minus-Ende abgebaut werden. Zu diesem Zeitpunkt kommt das Netto-Wachstum des Filaments zum Erliegen. Er wird auch als Tretmühlenzustand bezeichnet. (ALBERTS, 2011)

### 1.2.1.2. Kinetik der Aktinpolymerisation *in vitro*

Zeitlich betrachtet, lässt sich die Aktinpolymerisation in drei Phasen unterteilen, die zusammen den Verlauf einer sigmoidalen Sättigungskurve beschreiben:

- Verzögerungsphase: Dies ist die Zeit, die für die Nukleation der Monomere benötigt wird.
- Wachstumsphase: Dies ist die Phase der Elongation, während welcher sich fortwährend Monomere an das Filament anlagern.
- Gleichgewichtsphase: Diese Phase ist erreicht, wenn sich gleich viele Monomere an das Filament anlagern, wie wieder dissoziieren.

Der zeitliche Verlauf der Aktinpolymerisation *in vitro* ist in Abbildung 1.4 graphisch dargestellt.



**Abbildung 1.4: Zeitlicher Verlauf der Aktinpolymerisation *in vitro*.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der im Filament gebundenen Aktinuntereinheiten über die Zeit bei der Aktinpolymerisation, die durch die Zugabe von Salzen gestartet wird. Die Polymerisation lässt sich in die Verzögerungs-, die Wachstums- und die Gleichgewichtsphase einteilen. Aufgrund des Vorliegens einer Gleichgewichtsreaktion werden nie alle Aktinuntereinheiten im Filament gebunden sein. (modifiziert nach (ALBERTS, 2011))

Im Reagenzglas wird die Aktinpolymerisation durch mehrere Aspekte beeinflusst. Dabei sind der pH-Wert, die Ionenstärke der Lösung, das Vorhandensein divalenter Kationen als auch die Temperatur von Bedeutung. Aktin hat eine negative Nettoladung, sodass ein niedriger pH-Wert (pH 5-6) die Polymerisation begünstigt, da er dafür sorgt, dass die aziden Gruppen

neutralisiert werden. Die Ionenstärke der Lösung spielt ebenfalls, aufgrund der negativen Ladung des Aktins, eine Rolle. Bei einer niedrigen Ionenstärke stoßen sich die Aktimonomere voneinander ab. Dies ist bei höheren Ionenstärken (0,1 M NaCl) nicht der Fall. Allerdings dürfen diese auch nicht zu hoch sein, da sie sonst die elektrostatischen Interaktionen, die zur Polymerisation beitragen, abschwächen. Wie alle Nukleotid-bindenden Proteine benötigt auch Aktin für seine ATPase-Aktivität ein divalentes Kation ( $Mg^{2+}$ ) als Co-Faktor. Weiterhin begünstigen hohe Temperaturen (37°C) die Reaktionsgeschwindigkeit und somit auch die Polymerisation von Aktin. (CARRAWAY, CARRAWAY, C. A. C, ©1992; HIGGS, 2011)

### 1.2.2. Aktin-bindende Proteine

Unter physiologischen Bedingungen wird der stetige Auf-, Um- und Abbau der Aktinfilamente durch eine Reihe Aktin-bindender Proteine gesteuert.

Für das schnelle Wachstum und die Reorganisation der Aktinfilamente muss das Vorhandensein von G-Aktinmolekülen reguliert sein. Dies erfolgt durch die **Monomer-Bindeproteine**, zu denen unter anderem die Profiline und Thymosin- $\beta$ 4 zählen (GOLDSCHMIDT-CLERMONT et al., 1992). Durch die Bindung von Profilin an G-Aktin wird eine Konformationsänderung des Aktinmoleküls induziert, welche den Austausch von ADP gegen ATP ermöglicht, sodass das entstandene ATP-Aktin wieder an das Filament binden kann. Darüber hinaus fördern Komplexe aus Aktin und Profilin durch ihre Bindung an das Plus-Ende die Polymerisation (PRING et al., 1992). Thymosin- $\beta$ 4 bindet ebenfalls an Aktinmonomere nach ihrer Dissoziation vom Filament, blockiert aber den Austausch von ADP durch ATP und damit die Polymerisation.

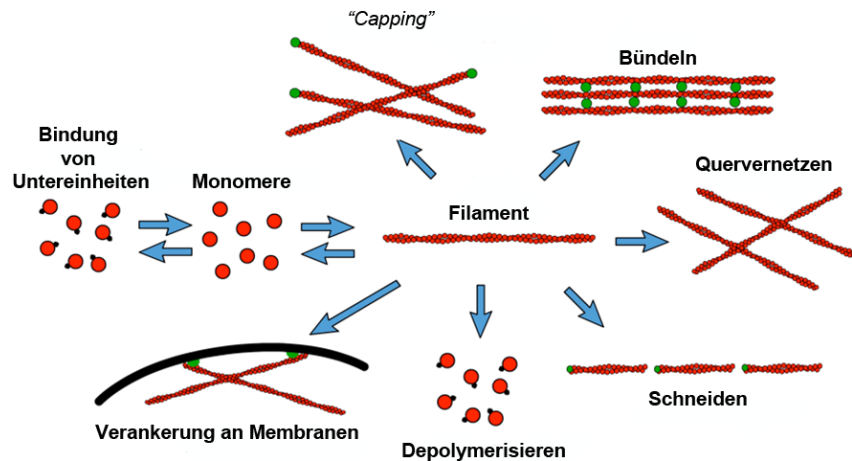
Wie bereits in Abschnitt 1.2.1.1 beschrieben, ist die Keimbildung aus 2-3 Aktinmonomeren als Ausgangspunkt für ein neues Filament ein thermodynamisch ungünstiger Prozess. Sogenannte **Nukleationsfaktoren** begünstigen die Zusammenlagerung der Aktinmonomere zu einem Keim. Zu diesen Nukleationsfaktoren zählen unter anderem der Arp2/3-Komplex (MULLINS et al., 1998) und die Formine (PRUYNE et al., 2002). Am Arp2/3-Komplex können Aktinmonomere binden, sodass ein stabiler Keim für die Aktinpolymerisation entsteht. Während der Polymerisation verbleibt der Arp2/3-Komplex am Minus-Ende des Filaments, so dass es nur am Plus-Ende zur Elongation kommt. Formine binden ebenfalls G-Aktinmoleküle, sodass ein Nukleationskeim entsteht. Allerdings verbleiben sie während der Polymerisation am Plus-Ende, an welchem sie die Elongation des Filaments fördern.

**Capping-Proteine** binden an das Ende eines Filaments und regulieren darüber dessen Länge. Dies kann sowohl am schnell als auch am langsam wachsenden Filamentende erfolgen. Durch eine Bindung am Plus-Ende wird die Gesamtlänge des Filaments verringert, während durch die Bindung am Minus-Ende die Dissoziation von Aktinmonomeren verhindert wird und es somit zur Elongation des Filaments kommt. Gelsolin und CapZ sind Beispiele für *Capping-Proteine* am Plus-Ende. Der Arp2/3-Komplex bindet am Minus-Ende des Filaments. Durch die **Bündelung von Aktinfilamenten** entstehen Strukturen höherer Ordnung, wie Stressfasern oder Mikrovilli. Proteine, wie  $\alpha$ -Actinin und Fimbrin besitzen meist mehrere Aktinbinde-Domänen, über die sie F-Aktin bündeln können. Weitere Proteine, die mehrere dieser Domänen besitzen, sorgen für eine **Quervernetzung der Filamente**. Zu diesen zählen unter anderem Filamin, Spectrin und Transgelin.

Die **Verankerung von Aktinfilamenten** an Membranen als auch an andere Elemente des Zytoskeletts ist für seine Funktion als Gerüstbildner essentiell. Dystrophin und Talin sind Beispiele für Proteine, die F-Aktin an Adhäsionsrezeptoren der Zellmembran verankern. Das Protein Plectin ist dagegen in der Lage, Aktinfilamente mit Mikrotubuli und mit Intermediärfilamenten zu verbinden.

Zur Förderung der Aktindynamik sind sowohl **schneidende** als auch **depolymerisierende Proteine** essentiell. Das Protein Gelsolin fungiert nicht nur als *Capping-Protein*, sondern ist auch ein bedeutendes Aktin schneidendes Protein (KWIATKOWSKI, 1999). Durch das Schneiden von Aktinfilamenten erhöht sich die Anzahl an freien Enden, an denen wiederum Polymerisation stattfinden kann. Die Mitglieder der ADF/Cofilin-Proteinfamilie haben eine bedeutende Rolle als Aktin depolymerisierende Proteine. Sie entfernen G-Aktin am Minus-Ende des Filaments und sorgen somit für einen erhöhten Aktin-Turnover. (AYSCOUGH, 1998; WINDER, AYSCOUGH, 2005; ALBERTS, 2011)

In Abbildung 1.5 ist schematisch die Regulation des Aktinzytoskeletts durch verschiedene Proteine dargestellt.



**Abbildung 1.5: Das Aktinskelett in der Zelle wird durch verschiedene Proteine reguliert.** Es gibt eine Vielzahl Aktin-bindender Proteine, die diverse Einflüsse auf Aktin haben. Monomer-Bindende Proteine regulieren das Vorhandensein von G-Aktin. Nukleationsfaktoren begünstigen die Zusammenlagerung der Aktinmonomere zu einem Keim. *Capping*-Proteine binden an eines der Filamentenden und regulieren so dessen Länge. Bündelnde und quervernetzende Proteine sorgen für die Entstehung von Strukturen höherer Ordnung. Verankernde Proteine verbinden Filamente mit Membranen oder anderen Zytoskelettelementen. Schneidende Proteine erhöhen die Anzahl an freien Filamentenden. Depolymerisierende Proteine entfernen G-Aktin vom Filament. (modifiziert nach [http://web.med.u-szeged.hu/mdbio/ger/material/2013-2014/I.Semester/zell\\_l/4/1.%20Zytoskelett.ppt.pdf](http://web.med.u-szeged.hu/mdbio/ger/material/2013-2014/I.Semester/zell_l/4/1.%20Zytoskelett.ppt.pdf))

### 1.2.2.1. Die ADF/Cofilin-Proteinfamilie

Die ADF (engl. *Actin Depolymerizing Factor*)/Cofilin (engl. *Cosediments with Filamentous Actin*)-Proteinfamilie umfasst drei Mitglieder, die die Aktindynamik erheblich beeinflussen: ADF, Cofilin1 und Cofilin2 (BAMBURG, 1999). Diese sind sowohl im Menschen, in der Maus und höchst wahrscheinlich auch in allen anderen Säugerarten exprimiert. Auf DNA-Ebene weisen die kodierenden Regionen aller drei Gene eine Sequenzidentität von 74 % auf (GURNIAK et al., 2005). In Bezug auf die Aminosäuresequenz besitzen murines Cofilin1 und Cofilin2 eine Ähnlichkeit von 80 % und weisen jeweils eine 70 %ige Übereinstimmung mit ADF auf. Während Cofilin1 in nahezu allen Zellen des Embryos und der adulten Maus exprimiert wird, ist der Hauptexpressionsort von Cofilin2 der Muskel und die ADF-Expression erfolgt hauptsächlich in Epi- und Endothel. (VARTIAINEN et al., 2002) Cofilin2 und ADF werden aber auch im Hirn exprimiert (BELLENCHI et al., 2007; GURNIAK et al., 2014).

Die wichtigste physiologische Funktion der Mitglieder der ADF/Cofilin-Proteinfamilie besteht in der Depolymerisation am Minus-Ende der Aktinfilamente, wodurch es zu einer Erhöhung der Aktindynamik kommt. Unter physiologischen Bedingungen binden die Proteine monomeres und filamentöses ADP-Aktin mit einer höheren Affinität als ATP-Aktin. (CARLIER

et al., 1997) Die Bindung an Aktin erfolgt über die ADF-Homologiedomäne (ADF-H) (LAPPALAINEN et al., 1998). Weiterhin sorgen die Proteine für eine Verwindung des Aktinfilaments (McGOUGH et al., 1997), was die thermodynamische Stabilität des F-Aktins beeinflusst und somit zu einem Brechen des Filaments führen kann (McGOUGH, CHIU, 1999). Darüber hinaus haben die Proteine der ADF/Cofilin-Familie eine schwache schneidende Aktivität gegenüber dem Aktinfilament. Dies erhöht die Anzahl freier Enden und fördert somit den Aktin-Turnover (MORIYAMA, YAHARA, 1999).

Trotz der ähnlichen biochemischen Eigenschaften aller Mitglieder der ADF/Cofilin-Proteinfamilie, führt das Ausschalten dieser Proteine in der Maus zu unterschiedlichen Phänotypen. Mäuse, denen das ADF-Protein fehlt, sind lebensfähig und zeigen lediglich eine erhöhte Proliferation der Cornea-Epithelzellen (IKEDA et al., 2003; BELLENCHI et al., 2007). Dagegen führt der Knock-out von Cofilin2 aufgrund eines fehlerhaften Aufbaus des Skelettmuskels zum Tod der Tiere kurz nach der Geburt (GURNIAK et al., 2014). Der Cofilin1-Knock-out ist aufgrund eines Defekts beim Schließen des Neuralrohrs embryonal letal (GURNIAK et al., 2005).

### 1.2.2.2. Cofilin1

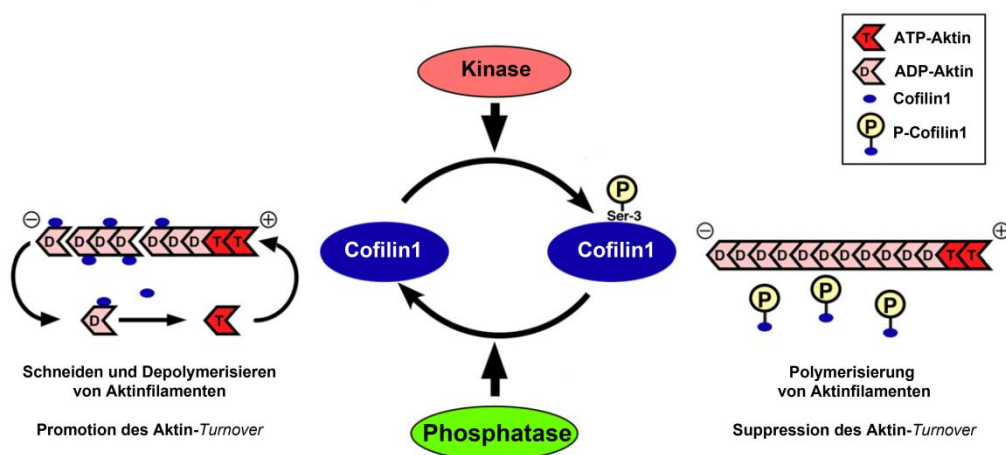
Das Mitglied Cofilin1 (Synonym: pp19) der ADF/Cofilin-Proteinfamilie wurde erstmals 1980 im embryonalen Hühnerhirn entdeckt (BAMBURG et al., 1980). In der Maus liegt das Cofilin1-Gen auf Chromosom 19 und umfasst vier Exons, von denen das Exon 1 ausschließlich das Startcodon ATG enthält (GURNIAK et al., 2005). Das Cofilin1-Protein besitzt ein Molekulargewicht von 20 kDa.

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2.1 beschrieben, hat Cofilin1 einen großen Einfluss auf die Aktindynamik in der Zelle, sodass dessen Aktivität streng kontrolliert sein muss. Während die Bindung von Cofilin1 an F-Aktin nur unerheblich über die Temperatur beeinflusst wird, ist sie dagegen stark von der Salzkonzentration und dem pH-Wert abhängig (CAO et al., 2006; ELAM et al., 2013). Die Cofilin1-Aktivität nimmt mit steigendem pH-Wert zu. (YONEZAWA et al., 1985)

Die Regulation der Cofilin1-Aktivität erfolgt über verschiedene Mechanismen. Durch Phosphorylierung von Cofilin1 an der Aminosäure Serin3 kann das Protein inaktiviert werden, da es in dieser Form weder an F- noch an G-Aktin binden kann (MORIYAMA et al., 1996). Die Phosphorylierung kann über verschiedene Kinasen erfolgen: LIM-Kinase 1 und 2 (LIMK 1 und LIMK 2) (ARBER et al., 1998; YANG et al., 1998; SUMI et al., 1999); TES-Kinase 1 und

2 (TESK 1 und TESK 2) (TOSHIMA, TOSHIMA, TAKEUCHI et al., 2001; TOSHIMA, TOSHIMA, AMANO et al., 2001). Durch die Phosphorylierung des Proteins kommt es zu einer Ladungsabstoßung zwischen Cofilin1 und Aktin und daher zu einer verminderten Fähigkeit an F-Aktin zu binden (BLANCHON et al., 2000). Die Dephosphorylierung von Cofilin1 führt wiederum zur Aktivierung des Proteins. Dies erfolgt durch folgende Phosphatasen: Protein-Phosphatase 1 und A2 (PP 1 und PP 2A) (AMBACH et al., 2000); Slingshot (SSH) (NIWA et al., 2002; OHTA et al., 2003); Chronophin (CIN) (GOHLA et al., 2005).

Abbildung 1.6 zeigt schematisch die Phospho-Regulation der Cofilin1-Aktivität.



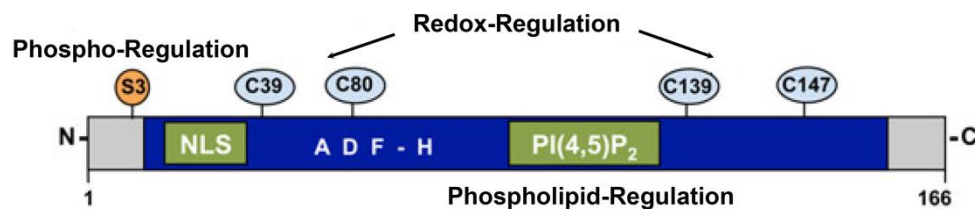
**Abbildung 1.6: Regulation der Cofilin1-Aktivität über Phosphorylierung.** Durch Kinasen wird Cofilin1 an der Aminosäure Serin3 phosphoryliert und damit der Aktin-Turnover erniedrigt, während Phosphatasen es dephosphorylieren und somit aktivieren. (modifiziert nach (MIZUNO, 2013))

Eine weitere Kontrolle der Cofilin1-Aktivität erfolgt über Phospholipid-Regulation. Die ADF-Homologiedomäne von Cofilin1 besitzt gleichzeitig auch eine Affinität für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ), das an der inneren Seite der Zellmembran lokalisiert ist, nicht aber für dessen Spaltprodukte 1,4,5-triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). Die Bindung von  $\text{PIP}_2$  an Cofilin1 inhibiert seine Aktin-Bindekapazität und somit die Depolymerisation von F-Aktin. (YONEZAWA et al., 1991; GORBATYUK et al., 2006)

Darüber hinaus kann die Cofilin1-Aktivität über Redox-Regulation an diversen Cysteinresten stattfinden. Durch Oxidation kommt es zu einer Konformationsänderung des Cofilin1 aufgrund einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten, wodurch es zwar noch in der Lage ist, an F-Aktin zu binden, während seine depolymerisierende Funktion jedoch verloren geht (KLEMKE et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress zur Translokation von Cofilin1 in Mitochondrien führt, wodurch es zur Apoptose kommt (CHUA et al., 2003;

WABNITZ et al., 2010). Eine Reduktion von Cofilin1 macht es, ebenfalls aufgrund von Konformationsänderungen, insensitive für eine Inhibierung durch  $\text{PIP}_2$ . Dies führt zu einer erhöhten Aktindynamik nahe der Membran, weil die depolymerisierende Aktivität von Cofilin1 unbeeinflusst bleibt (SCHULTE et al., 2013).

In Abbildung 1.7 sind die Regulationsstellen am Cofilin1-Protein dargestellt.



**Abbildung 1.7: Regulationsstellen von Cofilin1.** Die Phospho-Regulation erfolgt an Serin3, die Phospholipid-Regulation an der ADF-Homologiedomäne (ADF-H) und die Redox-Regulation an diversen Cysteinresten. (modifiziert nach (SAMSTAG et al., 2013))

Eine weitere Regulation des Cofilin1-Proteins erfolgt über Phosphorylierung am Tyrosin68 durch die Src-Tyrosin-Kinase. Dadurch wird zwar die Aktivität von Cofilin1 nicht verändert, aber es kommt zur verstärkten Ubiquitinierung des Proteins und somit zum Abbau über das Proteasom. (Yoo et al., 2010)

### 1.2.2.3. Bedeutung von Cofilin1 für das Immunsystem

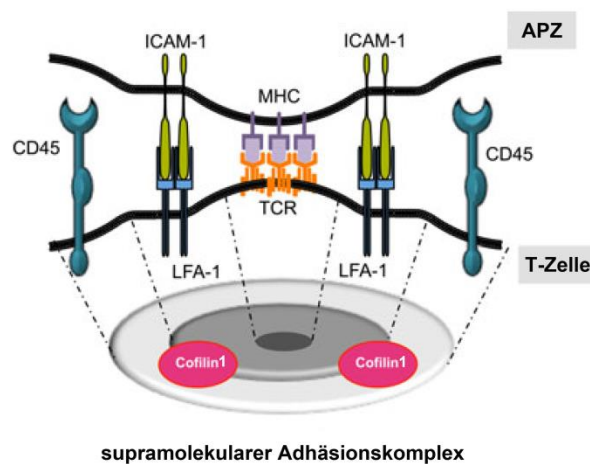
Wie bereits in Abschnitt 1.1.2.2 beschrieben, spielt das Aktinzytoskelett eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. Deshalb liegt es nahe, dass die Aktindynamik in diesen Zellen gezielt reguliert sein muss. Hierbei kommt Cofilin1 eine Schlüsselrolle zu.

Diverse *in vitro*-Untersuchungen, die überwiegend an humanen PBTs (engl. *Peripheral Blood T-Lymphocytes*) und an Jurkat-Zellen, einer immortalisierten humanen T-Zelllinie (SCHNEIDER et al., 1977) erfolgten, haben in der Vergangenheit einige Einblicke in die Rolle von Cofilin1 in T-Zellen liefern können.

Cofilin1 wird in diesen Zellen stark exprimiert und ist in ruhenden T-Zellen phosphoryliert und inaktiv, während es in aktivierten T-Zellen dephosphoryliert und aktiv vorliegt (SAMSTAG et al., 1994). Die Aktivierung von T-Zellen über den T-Zellrezeptorkomplex und die gleichzeitige Stimulation der Co-Rezeptoren CD2 oder CD28 führt nur zu einer Aktivierung von T-Zellen, wenn Cofilin1 dephosphoryliert und aktiv ist. Eine Blockierung der Aktinbindung von Cofilin1 führt dagegen zu einer reduzierten Sekretion des



Wachstumsfaktors Interleukin-2, was einen Hinweis auf eine verminderte Aktivierung der T-Zellen liefert. (EIBERT et al., 2004) Bei der Ausbildung der immunologischen Synapse (vgl. Abschnitt 1.1.2.2) konnte Cofilin1 im supramolekularen Adhäsionskomplex nachgewiesen werden (SIMS et al., 2007) (vgl. Abbildung 1.8). Cofilin1 scheint ein wichtiges Bindeglied zwischen der Aktivierung von T-Zellen und der dafür notwendigen Aktindynamik darzustellen (LEE et al., 2000).



**Abbildung 1.8: Cofilin1 spielt eine Rolle bei der Bildung der immunologischen Synapse.** Das Cofilin1-Protein ist im supramolekularen Adhäsionskomplex an der Kontaktstelle zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle (APZ) lokalisiert. Im Adhäsionskomplex bindet der T-Zellrezeptorkomplex an ein MHC-gebundenes Antigen. Das Adhäsionsmolekül LFA-1 bindet an ICAM-1. CD45 ist eine Tyrosinphosphatase, die aufgrund ihres großen extrazellulären Bereichs in der Peripherie des Komplexes angeordnet ist. (modifiziert nach (SAMSTAG et al., 2013))

Die Dephosphorylierung von Cofilin1 nach T-Zellaktivierung erfolgt vermutlich über den Ras-MEK/PI3K-Signalweg, der zur Inhibierung der LIM-Kinase 1 und 2 führt (NEBL et al., 2004; WABNITZ et al., 2006; KLEMKE et al., 2010). Es wird postuliert, dass eine schnellere Aktivierung von Cofilin1 in stimulierten T-Zellen auch über Phospholipid-Regulation durch PIP<sub>2</sub>-Spaltung erfolgt. Durch die Stimulation von T-Zellen über dendritische Zellen kann über die Freisetzung von Thiolen ein reduzierendes Milieu in der T-Zelle erzeugt werden, wodurch über Redox-Regulation ebenfalls aktiviertes Cofilin1 freigesetzt wird, welches ursprünglich an der Plasmamembran an PIP<sub>2</sub> gebunden vorlag. (SAMSTAG et al., 2013)

Nach der Aktivierung von T-Zellen konnte gezeigt werden, dass dephosphoryliertes, aktiviertes Cofilin1 in den Zellkern transloziert (SAMSTAG et al., 1994; NEBL et al., 1996). Eine Blockade der Protein-Phosphatasen PP 1 und PP 2A, die Cofilin1 aktivieren, führt zu einer Erhöhung der Apoptose in T-Zellen (SAMSTAG et al., 1996). Es wird vermutet, dass die

ausbleibende Cofilin1-Translokation in den Zellkern dafür verantwortlich ist. Cofilin1 bildet mit Aktin zusammen „Stäbchen“, sogenannte *Rods*, die intranuklear die apoptotische Defragmentierung der DNA verhindern, da Aktin die DNase1 inhibiert (BLIKSTAD et al., 1978). Bleibt dies aus, kommt es in den Zellen zu Apoptose (SAMSTAG et al., 2013). Eine weitere Aufgabe von Cofilin1 im Zellkern ist sehr wahrscheinlich auch die Steigerung der Transkription (SAMSTAG et al., 1994).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die über den Ras-MEK/PI3K-Signalweg induzierte Aktivierung von Cofilin1 auch eine Rolle bei der Migration von T-Zellen spielt (KLEMKE et al., 2010). In migrierenden Zellen wird die Cofilin1-Aktivität durch Phospho-Regulation über die LIM-Kinase 1 und die Phosphatase Slingshot bestimmt (NISHITA et al., 2005), was demnach vermutlich nachgeschaltete Komponenten des Ras-MEK/PI3K-Signalwegs sind.

*In vivo*-Untersuchungen an Mäusen in unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Cofilin1 auch eine wichtige Bedeutung bei der T-Zellreifung zukommt. Eine Deletion von Cofilin1 in einer frühen Phase der T-Zellentwicklung im Thymus führt zu einer Blockade der T-Zellreifung im doppelt positiven Stadium. Die Thymozyten erreichen nicht das einfach positive Stadium und verbleiben stattdessen als doppelt positive Thymozyten. Im Thymus durchwandern die T-Zellen während ihrer Reifung unterschiedlich aufgebaute Areale, wobei sie mit anderen Zellen interagieren müssen. Bei diesen Prozessen ist die Dynamik von Aktin entscheidend. Der Entwicklungsdefekt ist daher sehr wahrscheinlich auf Adhäsions- und Migrationsdefekte hervorgerufen durch das Fehlen von Cofilin1 in diesen Zellen zurückzuführen. (SALZ, 2011; persönliche Mitteilung, Andrée Salz)

Die Regulation der Cofilin1-Aktivität in T-Zellen spielt auch bei Krankheiten eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass der HI-Virus durch eine Bindung an den CXCR4-Rezeptor an T-Helferzellen, Cofilin1 aktiviert, wodurch es zu erhöhter Aktindynamik im kortikalen Bereich und somit zur Aufnahme des Virus in die Zelle kommt (YODER et al., 2008). Nach erfolgreichem Eindringen des HI-Virus in die Zelle, nutzt dieser die Proteinexpressions-Maschinerie seiner Wirtszelle, wobei unter anderem der Faktor Nef exprimiert wird. Dieser sorgt für eine Inaktivierung von Cofilin1, was wiederum die Migration der infizierten T-Zellen beeinträchtigt, sodass diese nicht mehr ihrer Funktion für das Immunsystem nachkommen können. (WU et al., 2008; STOLP et al., 2009) Weiterhin scheint die Inhibierung von Cofilin1 über die LIM-Kinase 1 bei der Freisetzung des HI-Virus aus der Wirtszelle von Bedeutung zu sein (WEN et al., 2014).

### 1.3. Methoden zur Regulation der Proteinexpression *in vivo*

Mittlerweile gibt es diverse Methoden zur Regulation der Proteinexpression *in vivo*, die auf DNA, RNA oder direkt auf Proteinebene ansetzen können. Die neueste und brisanteste stellt dabei sicherlich das CRISPR/Cas9-System dar. Es besteht aus den CRISPR-Sequenzen (engl. *Clustered Regulatory Interspace Palindromic Repeats*), bestimmte RNA-Sequenzen, die von dem „CRISPR assoziierten Protein“ Cas9, einer Nuklease, erkannt werden. Weiterhin beinhaltet die CRISPR-Sequenz komplementäre Sequenzen zu einer entsprechenden Ziel-DNA, in die dann wiederum über die Nuklease Doppelstrangbrüche eingefügt werden können, die die Erzeugung von Knock-out- und Knock-in-Mutanten ermöglichen. (JINEK et al., 2012; KA et al., 2014) Weitere Methoden zur gezielten Mutation des Genoms sind sowohl die Zink-Finger-Nukleasen (URNOV et al., 2005) und TALENS (MUSSOLINO et al., 2011) als auch die RNA-Interferenz (FIRE et al., 1998). Im Zuge dieser Arbeit wurde das klassische Cre/loxP-System verwendet, welches die gezielte Entfernung markierter Sequenzen im Genom ermöglicht (STERNBERG, HAMILTON, 1981). Weiterhin stellt die Aptamer-Technologie eine weitere Möglichkeit dar, direkt auf Proteinebene die Aktivität des Zielmoleküls zu regulieren (ELLINGTON, SZOSTAK, 1990).

#### 1.3.1. Konditionale Regulation der Genexpression in der Maus – Das Cre/loxP-System

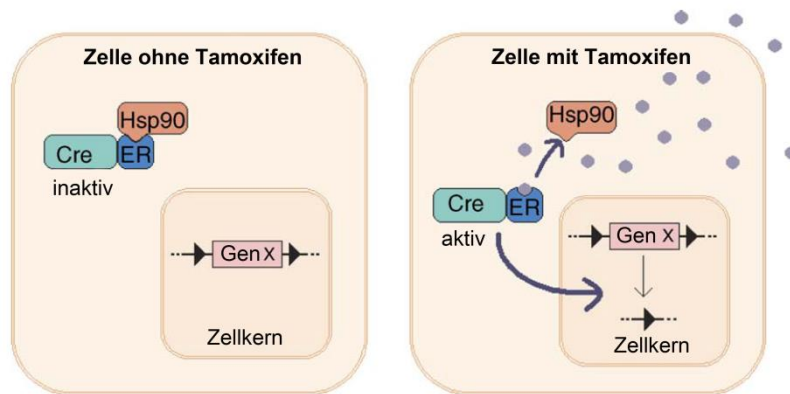
Bei der konventionellen Regulation der Genexpression in der Maus, die zu einem ubiquitären Knock-out (Deletion eines Gens) bzw. Knock-in (Austausch eines Gens) von Gensequenzen führt, kommt es häufig zur Letalität des Organismus. Dagegen kann über den Ansatz der konditionalen Geninaktivierung, die Genexpression entwicklungs- und gewebespezifisch reguliert werden (LEWANDOSKI, 2001). Dazu bedient man sich meist des Cre/loxP-Systems.

Die Cre-Rekombinase (engl. *Cause Recombination*) stammt aus dem Bakteriophagen P1. Für die Rekombination benötigt sie bestimmte Erkennungssequenzen, die als loxP-Stellen (engl. *locus of crossing (x) over of P1*) bezeichnet werden. Die loxP-Sequenz ist eine 34 bp lange Sequenz, die aus einer 8 bp langen Kernsequenz besteht, welche von zwei 13 bp langen palindromischen Sequenzen umgeben wird. Flankieren loxP-Sequenzen eine DNA-Sequenz spricht man von einer „geflochten“ (engl. *flanked by loxP-sites*) Zielsequenz. Sind die loxP-Sequenzen entgegengesetzt orientiert, erfolgt eine Inversion des dazwischen liegenden DNA-Bereichs.

Bei der konditionalen Deletion von Genen ist die zu deletierende Sequenz von zwei loxP-Stellen gleicher Orientierung flankiert. Durch die Aktivität der Cre-Rekombinase, die unter einem gewebespezifischen Promotor exprimiert wird, kann es zu einer gezielten Ausschaltung der Zielsequenz kommen. In den letzten Jahren wurden viele unterschiedliche Cre-Rekombinase-Mauslinien hergestellt, die die Cre-Rekombinase unter einem spezifischen Promotor exprimieren und somit zur konditionalen Deletion eingesetzt werden können. Es muss beachtet werden, dass mit diesem System nie eine 100 %ige Deletion der Zielsequenz erfolgt. Teilweise wird die Cre-Rekombinase auch nicht in allen Zielzellen gleich stark exprimiert. Anderenfalls kann es zu einer ektopischen Aktivität der Cre-Rekombinase kommen. Aus diesen Gründen ist es essentiell, die tatsächliche Gewebespezifität und die Effizienz der verwendeten Cre-Rekombinase zu kennen. (NAGY, 2000)

### **1.3.1.1. Induzierbare Deletion eines Gens – Tamoxifen-Induktion der Cre-Rekombinase**

Um nicht nur eine örtliche Kontrolle über die durch die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion zu haben, sondern auch einen zeitlichen Einfluss nehmen zu können, verwendet man das induzierbare Cre/loxP-System (FEIL, 2007). In diesem System wird die Cre-Rekombinase fusioniert mit einer mutierten Liganden-Bindedomäne des humanen Estrogenrezeptors exprimiert. Der Estrogenrezeptor (ER) ist ein nuklearer Rezeptor, der in seinem inaktiven Zustand gebunden an das HSP90-Protein im Zytoplasma vorliegt. Durch Ligandenbindung wird das HSP90-Protein verdrängt und der Rezeptor kann nun in den Zellkern gelangen. Die Mutation in der Liganden-Bindedomäne des CreER-Fusionsproteins sorgt dafür, dass eine Freisetzung durch das endogene Estrogen nicht mehr möglich ist. Stattdessen wird dazu der Estrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen benötigt. Die Bindung von Tamoxifen an das CreER-Fusionprotein sorgt für eine Translokation der Cre-Rekombinase in den Zellkern, wo diese Rekombinationen katalysieren kann (vgl. Abbildung 1.9). Man differenziert zwei CreER-Fusionsproteine, die sich in der Mutation der Liganden-Bindedomäne unterscheiden. Das CreER<sup>T2</sup>-Fusionsprotein besitzt eine vierfach höhere Effizienz als das mit CreER<sup>T</sup> (INDRA et al., 1999).

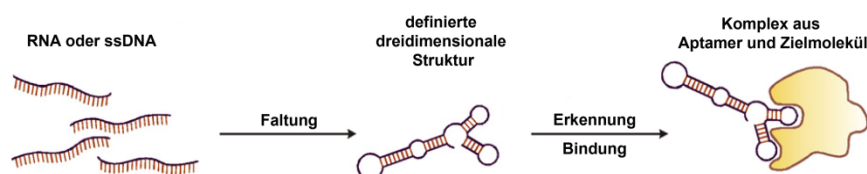


**Abbildung 1.9: Die Aktivität der Cre-Rekombinase des CreER-Fusionsproteins ist durch Tamoxifen induzierbar.** In Abwesenheit von Tamoxifen liegt das Fusionsprotein gebunden an das HSP90-Protein im Zytosol vor. Durch die Anwesenheit von Tamoxifen wird das HSP90 verdrängt und das Fusionsprotein gelangt in den Zellkern, wo es über seine Rekombinaseaktivität ein von loxP-Stellen flankiertes GenX deletieren kann. (modifiziert nach (TIAN et al., 2006))

Die Induktion der Cre-Rekombinase kann sowohl *in vitro*, durch Zugabe des Tamoxifens ins Zellkulturmedium erfolgen, oder aber auch *in vivo* indem es der Maus direkt injiziert wird.

### 1.3.2. Aptamere als molekulare Werkzeuge

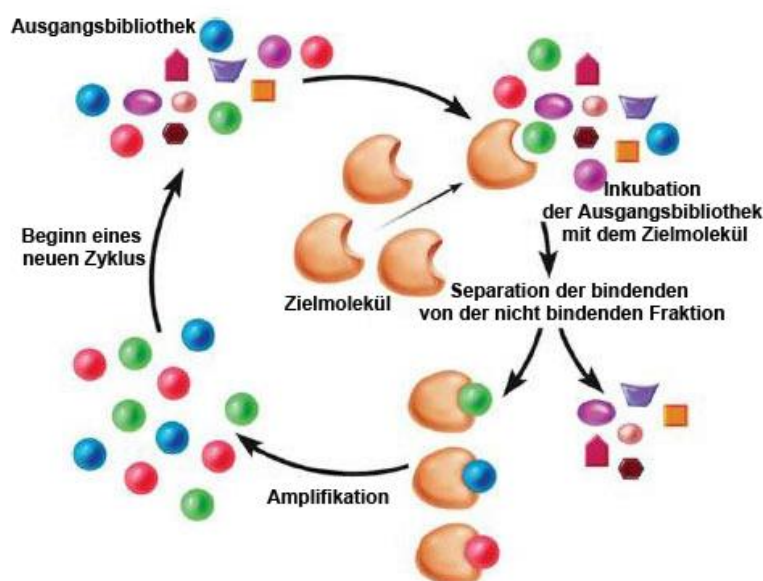
Aptamere (lat. *aptus*, passen; griech. *meros*, Teil) sind kurze Nukleotide aus RNA oder ssDNA, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur sehr selektiv und spezifisch an ihr Zielmolekül binden (vgl. Abbildung 1.10). Sie zeigen Affinitäten für ihr Zielmolekül, die vergleichbar mit der monoklonaler Antikörper sind (STOLTENBURG et al., 2007). Häufig haben die Aptamere nicht nur die Fähigkeit an ihr Zielmolekül zu binden, sondern inhibieren auch gleichzeitig dessen Funktion (LIN, JAYASENA, 1997). Die Bindung des Aptamers an das Zielmolekül erfolgt über strukturelle Kompatibilität, *Stacking Effects* der Basen, elektrostatische und van-der-Waals Kräfte oder über eine Kombination dieser Interaktionen (HERMANN, PATEL, 2000).



**Abbildung 1.10: Bindung eines Aptamers an sein Zielmolekül.** Kurze Nukleotide aus RNA oder ssDNA binden über ihre definierte dreidimensionale Struktur an ihr Zielmolekül. (modifiziert nach (STOLTENBURG et al., 2007))

Die Selektion einer Aptamersequenz erfolgt nach dem SELEX (engl. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*)-Verfahren, einer *in vitro*-Methode, bei der es zur

systematischen Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung kommt (ELLINGTON, SZOSTAK, 1990; TUEK, GOLD, 1990). Die SELEX ist ein sich wiederholender Prozess aus drei Schritten: Selektion, Elution und Amplifikation. Zu Beginn steht die Inkubation der Nukleinsäurebibliothek mit dem Zielmolekül. Anschließend erfolgt die Separation der bindenden Nukleinsäuresequenzen von der Fraktion, die nicht bindet. Zuletzt folgt die Amplifikation der bindenden Nukleinsäuresequenzen, bevor ein neuer SELEX-Zyklus beginnt. Abbildung 1.11 zeigt schematisch den Ablauf einer solchen SELEX-Runde.



**Abbildung 1.11: Schematischer Ablauf einer SELEX-Runde.** Die drei Hauptschritte sind die Inkubation der Nukleinsäurebibliothek mit dem Zielmolekül, gefolgt von der Separation der bindenden von der nicht bindenden Fraktion und letztendlich die Amplifikation der bindenden Sequenzen bevor ein neuer Zyklus durchgeführt wird. (modifiziert nach <http://sciences.surgery.duke.edu/files/images/selexWEB.jpg>)

Bei der Auswahl des Zielmoleküls für die SELEX sind kaum Grenzen gesetzt. Es kann sowohl gegen Proteine, ganze Zellen und Gewebe, als auch gegen kurze Peptide, organische und anorganische Moleküle selektiert werden. Das Zielmolekül sollte dabei in ausreichender Menge und Reinheit vorhanden sein. Weiterhin sollte es einige Eigenschaften aufweisen, damit die Selektion des Aptamers erfolgreich verläuft. Dazu zählen positiv geladene Gruppen, das Vorhandensein von Protonendonatoren- und -akzeptoren und planare Gruppen. (STOLTENBURG et al., 2007) Um während der SELEX eine effiziente Separation der bindenden Nukleinsäuresequenzen, von denen, die nicht binden, gewährleisten zu können, muss das Zielmolekül an ein geeignetes Material immobilisiert werden. Dies kann beispielsweise durch die Kopplung über Affinitäts-*Tags* an Sepharose-*Beads* erfolgen (LIU,

STORMO, 2005). Eine weitere Möglichkeit ist die Kopplung des Zielmoleküls an magnetische *Beads* (STOLTENBURG et al., 2005). Hierbei benötigt man sehr viel geringere Mengen des Zielmoleküls und darüber hinaus ist die Handhabung sehr komfortabel.

Ausgangspunkt einer SELEX ist die chemisch über Festphasensynthese hergestellte DNA-Oligonukleotid-Bibliothek. Ein solches Oligonukleotid ist so designt, dass es eine zentrale, randomisierte Region von 20-80 nt enthält, die durch konstante Primer-Regionen am 5'- und 3'-Ende flankiert wird. Die randomisierte Region enthält in der Regel mit gleicher Wahrscheinlichkeit pro Position eine der vier Basen, sodass sich beispielsweise bei einer 50 nt langen Region eine Sequenzdiversität von  $4^{50}$  verschiedenen Kombinationen ergibt. Durch die beidseitigen Primer-Regionen lässt sich die Bibliothek über PCR (vgl. Abschnitt 3.1.1.5) amplifizieren. Im Falle der Selektion eines RNA-Aptamers enthalten die konstanten Regionen auch die Promotor-Region für eine RNA-Polymerase, sodass im Zuge einer Transkription die DNA-Sequenz in eine RNA-Sequenz umgeschrieben werden kann. (STOLTENBURG et al., 2007)

Jeder SELEX-Zyklus startet mit der Inkubation der Oligonukleotid-Bibliothek und dem immobilisierten Zielmolekül. Dabei können entsprechend der späteren Anwendung die Bedingungen für den Selektionsschritt gewählt werden. Nach dieser Inkubation werden die bindenden Sequenzen von denen ohne Affinität getrennt. Die Elution der bindenden Sequenzen kann durch Hitzebehandlung (STOLTENBURG et al., 2005) oder durch die Zugabe von chelatierenden und denaturierenden Substanzen, wie EDTA, Harnstoff oder SDS (WEISS et al., 1997; BIANCHINI et al., 2001; THEIS et al., 2004) erfolgen. Die folgende Amplifikation der bindenden Nukleinsäuren erfolgt im Falle eines DNA-Aptamers, durch PCR und anschließende Separation der Einzelstränge. Wird ein RNA-Aptamer selektiert, müssen die Sequenzen zunächst revers transkribiert werden, bevor sie über PCR amplifiziert und letztendlich wieder transkribiert werden, sodass sie in den nächsten Zyklus eingesetzt werden können. In der Regel werden 6-20 SELEX-Runden benötigt, um eine Anreicherung bindender Sequenzen im Oligonukleotid-Pool zu gewährleisten (STOLTENBURG et al., 2007). Diese Anreicherung wird dann in einem Bindungsassay überprüft. Im Filterbindungsassay kann beispielsweise die Bindung der Sequenzen an Proteine als Zielmolekül untersucht werden. Dazu werden die Oligonukleotide radioaktiv markiert. Das Zielprotein wird von einer Nitrocellulosemembran zurückgehalten, sodass radioaktiv markierte Sequenzen, die an das Protein binden, nachgewiesen werden können. Konnten mit Hilfe von Bindungsassays

affine Sequenzen für das Zielmolekül identifiziert werden, werden diese wiederum in bakterielle Vektoren kloniert und sequenziert, bevor dann gezielt einzelne Sequenzen weiter charakterisiert werden können.

Zur Verbesserung der Spezifität und Sensitivität der selektieren Aptamer-Sequenz kann weiterhin eine Re-SELEX durchgeführt werden. Dazu wird, basierend auf der erhaltenen Sequenz, eine neue Bibliothek synthetisiert, wobei in den ursprünglich randomisierten Bereich die Nukleotide mit einer festgelegten Mutageneserate von z.B. 15 % eingebaut werden. Die Synthese dieser neuen Bibliothek erfolgt aufgrund der Tatsache, dass die theoretische Sequenzdiversität von der tatsächlichen abweicht. In der mutagensierten Bibliothek sind somit geringfügig abgewandelte Sequenzen der bisher gefundenen enthalten, die gegebenenfalls noch besser an das Zielmolekül binden. Deshalb wird mit dieser neuen Bibliothek eine weitere SELEX durchgeführt, die dann als Re-SELEX bezeichnet wird.

Im Anschluss an das SELEX-Verfahren kann die erhaltene Aptamersequenz noch weiter modifiziert werden. Durch das Einführen chemischer Modifikationen der Basen kann beispielsweise die Stabilität des Aptamers erhöht werden. Weiterhin kann die gefundene Sequenz auch mit einem Fluoreszenz-*Tag* versehen werden, um die Bindung an das Zielmolekül, z.B. mikroskopisch, sichtbar zu machen. (STOLTENBURG et al., 2007)

Aptamere spielen mittlerweile eine bedeutende Rolle in der Arzneimittelforschung. Einige von ihnen befinden sich bereits in klinischen Studien für die Zulassung als Medikament (KEEFE et al., 2010). Im Jahr 2004 kam das Aptamer „Pegaptanib“ als erstes Arzneimittel in den USA auf den Markt (GRAGOUDAS et al., 2004). Dieses Aptamer bindet spezifisch an VEGF (engl. Vascular Endothelial Growth Factor), welcher in die altersabhängige Makuladegeneration involviert ist.



## 1.4. Zielsetzung der Arbeit

Untersuchungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass die Regulation der Aktindynamik durch den Aktin depolymerisierenden Faktor Cofilin1 in T-Zellen nicht nur für die Migration dieser Zellen, sondern auch für die Aktivierung und Ausbildung der immunologischen Synapse von Bedeutung ist. Dieses Wissen stammt überwiegend aus *in vitro*-Studien. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Cofilin1 und Aktindynamik für die Funktion von T-Zellen *in vivo*, mit Hilfe der Maus als Modellorganismus, zu untersuchen.

Es ist bekannt, dass der vollständige Knock-out von Cofilin1 aufgrund eines Defekts beim Schließen des Neuralrohrs zu früher embryonaler Letalität führt. Um diese Problematik zu umgehen, sollte zunächst ein molekulargenetischer Ansatz, bei dem verschiedene Mausmodelle zum Einsatz kamen, angewendet werden. Zu Beginn sollten Auswirkungen eines Austausches der Aminosäure Serin3 im Cofilin1-Gen, der zu konstitutiv aktivem bzw. inaktivem Protein führt, auf die Polymerisation von Aktin *in vitro* analysiert werden. Im Anschluss sollten die beiden Mutationen *in vivo* im Mausmodell hinsichtlich ihres Einfluss auf T-Zellen untersucht werden. Die Analysen sollten überwiegend mit Hilfe des Durchflusszytometers auf zellulärer Ebene erfolgen.

Da in unserer Arbeitsgruppe bereits durch Untersuchungen einer Mauslinie gezeigt werden konnte, dass eine Cofilin1-Deletion in einer frühen Phase der T-Zellentwicklung zu einer Blockade der Reifung im doppelt positiven Stadium der Thymozyten führt, musste für ein Studium reifer Cofilin1-defizienter T-Zellen eine Cre-Mauslinie verwendet werden, deren Rekombinase in einer späten Phase der T-Zellreifung aktiv ist. Für die Charakterisierung reifer T-Zellen mit Cofilin1-Deletion sollten ebenfalls hauptsächlich durchflusszytometrische Analysen auf Zellebene durchgeführt werden. Darüber hinaus wurde durch den Einsatz einer Tamoxifen-induzierbaren Mauslinie die Cofilin1-Deletion *in vitro* in primären T-Zellen herbeigeführt.

In einem weiteren Ansatz sollte mit Hilfe der Aptamer-Technologie die Cofilin1-Aktivität gegenüber Aktin spezifisch moduliert werden. Mit Hilfe des SELEX-Verfahrens sollte eine Cofilin1-bindende RNA-Aptamersequenz gefunden werden. Diese sollte dann hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Cofilin1-Funktion in Aktin-Assays untersucht werden.

## 2. Material

Alle hier aufgeführten Chemikalien werden von den Firmen AppliChem, Roth, Sigma und Merck bezogen. Restriktionsenzyme werden bei der Firma New England BioLabs bestellt. Radioaktive Nukleotide werden bei der Firma PerkinElmer geordert. Lösungen für die Zellkultur stammen von der Firma Gibco.

### 2.1. Lösungen, Puffer und Medien

Die unten aufgeführten Lösungen, Puffer und Medien werden, sofern nicht anders angegeben, mit hochreinem MilliQ-Wasser angesetzt und bei RT gelagert. Die pH-Werte werden mit NaOH, HCl oder Essigsäure eingestellt.

#### 2.1.1. Allgemein

<b>1x PBS<sup>-</sup></b>	9,6 g	Dulbecco's PBS in 1 l Wasser lösen und autoklavieren
<b>10x PBS<sup>-</sup></b>	96 g	Dulbecco's PBS in 1 l Wasser lösen und autoklavieren

#### 2.1.2. Molekularbiologie

##### 2.1.2.1. Nukleinsäureanalytik

<b>Proteinase K-Lösung</b>	10 µg/µl	Proteinase K Lagerung bei -20°C
----------------------------	----------	------------------------------------

<b>Tent-Puffer</b>	20 mM	Tris pH 6,8
	0,1 mM	EDTA
	1 % (v/v)	Tween-20
	0,2 % (v/v)	Triton X-100
	vor Gebrauch Zugabe von 400 µl Proteinase K-Lösung pro 10 ml, dann Lagerung bei -20°C	
<b>Laird-Puffer</b>	100 mM	Tris pH 8,5
	5 mM	EDTA
	200 mM	NaCl
	0,2 % (v/v)	SDS
	vor Gebrauch Zugabe von 400 µl Proteinase K-Lösung pro 10 ml, dann Lagerung bei -20°C	
<b>TE-Puffer</b>	10 mM	Tris pH 8,0
	1 mM	EDTA
<b>50x TAE-Puffer</b>	2 M	Tris
	50 mM	EDTA pH 8,0
	1 M	Essigsäure
<b>6x DNA-Ladepuffer</b>	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (w/v)	Xylencyanol
	40 % (w/v)	Saccharose
	0,5 % (v/v)	SDS
<b>Alkalische Lösung 1</b>	50 mM	D-Glukose
	25 mM	Tris
	10 mM	EDTA pH 8,0

## Material

---

<b>Alkalische Lösung 2</b>	0,2 M	NaOH
	1 % (v/v)	SDS
<b>Alkalische Lösung 3</b>	3 M	Kaliumacetat
	5 M	Ammoniumacetat
<b>Denaturierungs-Puffer (Southern)</b>	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
<b>Neutralisierungs-Puffer (Southern)</b>	0,5 M	Tris pH 7,5
	1,5 M	NaCl
<b>Stopp-Puffer (Southern)</b>	50 mM	Tris
	20 mM	EDTA pH 8,0
<b>20x SSC (pH 7,0-8,0) (Southern)</b>	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitrat
		nach Verdünnung / vor Gebrauch Zugabe von 0,1 % (v/v) SDS
<b>Hybridisierungs-Puffer (Southern)</b>	1 % (w/v)	BSA
	1 mM	EDTA
	0,5 M	N <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,2
	7 % (v/v)	SDS
<b>Wasch-Puffer (pH 7,2) (Southern)</b>	1 mM	EDTA
	40 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1 % (v/v)	SDS

### 2.1.2.2. Bakterienkultur

<b>LB-Medium</b>	1 % (w/v)	NaCl
	1 % (w/v)	Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefe-Extrakt
		→ autoklavieren
<b>LB-Agar</b>	1,5 % (w/v)	Agar
		in LB-Medium
		→ autoklavieren
		→ ggf. anschließend Zugabe eines Antibiotikums bei 55°C
<b>Ampizillin-Stammlösung</b>	50 mg/ml	Ampizillin
		Lagerung bei -20°C
		Selektionsmedium: 50 µg/ml
<b>Carbenizillin-Stammlösung</b>	40 mg/ml	Carbenizillin
		Lagerung bei -20°C
		Selektionsmedium: 40 µg/ml
<b>Kanamycin</b>	25 mg/ml	Kanamycin
		Lagerung bei -20°C
		Selektionsmedium: 25 µg/ml

### 2.1.3. Biochemie

<b>PEB-Puffer</b>	20 mM	Tris pH 8,0
	100 mM	NaCl
	5 mM	EGTA
	2 mM	EDTA
	0,5 % (v/v)	Triton X-100
		Lagerung bei 4°C vor Gebrauch Zugabe von einer Tablette Protease-Inhibitor pro 10 ml
<b>5x SDS-Probenpuffer</b>	110 mM	Tris pH 6,8
	20 % (v/v)	Glyzerin
	3,8 % (v/v)	SDS
	8 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,1 %	Bromphenolblau Lagerung bei -20°C
<b>10x SDS-Laufpuffer</b>	250 mM	Tris
	1,9 M	Glyzin
	1 % (v/v)	SDS
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau
	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Eisessig → ÜN rühren, dann filtrieren
<b>Coomassie-Entfärbelösung</b>	30 % (v/v)	Isopropanol
	6 % (v/v)	Eisessig

<b>Towbin-Transferpuffer</b>	25 mM	Tris pH 8,5
	190 mM	Glyzin
	20 % (v/v)	Methanol
<b>10x NCP</b>	0,6 M	Tris pH 8,0-8,2
	1,5 M	NaCl
	0,5 % (v/v)	Tween-20
		optional: Zugabe von 0,2 % NaN <sub>3</sub>
		nach Verdünnung / vor Gebrauch Zugabe von 5 % Milchpulver
<b>Luminol-Stammlösung</b>	0,44 g	Luminol in 10 ml DMSO Lagerung bei -20°C
<b>p-Hydroxycumarin-Stammlösung</b>	150 mg	p-Hydroxycumarin in 1 ml DMSO Lagerung bei -20°C
<b>ECL-Lösung A</b>	200 ml	0,1 M Tris pH 8,6
	4 ml	Luminol-Stammlösung
	0,1 ml	p-Hydroxycumarin-Stammlösung Lagerung bei 4°C im Dunkeln
<b>ECL-Lösung B</b>	200 ml	0,1 M Tris pH 8,6
	0,2 ml	30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Lagerung bei 4°C im Dunkeln

## Material

---

<b>Lysis-Puffer</b>	5 mM	EDTA
	0,5 % (v/v)	Triton X-100
	10 % (w/v)	Saccharose
		in PBS vor Gebrauch Zugabe von einer Tablette Protease-Inhibitor pro 50 ml
<b>GST-Waschpuffer</b>	0,1 % (v/v)	Triton X-100 in PBS
<b>GST-Elutionspuffer</b>	50 mM	Tris pH 8,0
	15 mM	Glutathion
<b>GST-Lagerungslösung</b>	0,1 % (w/v)	NaN <sub>3</sub>
	5 mM	EDTA
		in PBS
<b>Strep-Tag-Waschpuffer pH 8,0</b>	100 mM	Tris pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
<b>Strep-Tag-Waschpuffer pH 10,5</b>	100 mM	Tris pH 10,5
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
<b>Strep-Tag-Elutionspuffer</b>	100 mM	Tris pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2,5 mM	D-Desthiobiotin



<b>Strep-Tag-Regenerationspuffer</b>	100 mM	Tris pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	HABA
<b>10x G-Puffer</b>	20 mM	Tris
	2 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,1 % (w/v)	NaN <sub>3</sub>
		nach Verdünnung / vor Gebrauch Zugabe von 0,2 mM ATP, pH- Wert auf 8,0, 0,1 mM DTT
<b>50x Polymerisationspuffer</b>	2,5 M	KCl
	0,1 M	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	ATP
		→ pH 7,2
<b>10x Assay-Polymerisationspuffer pH 7,0</b>	20 mM	MgCl <sub>2</sub>
	500 mM	KCl
	1 mM	DTT
	100 mM	HEPES
	100 mM	PIPES
<b>10x Assay-Polymerisationspuffer pH 8,3</b>	20 mM	MgCl <sub>2</sub>
	500 mM	KCl
	1 mM	DTT
	100 mM	Tris
<b>P-Puffer pH 7,5-7,8 (Pyren-Aktin)</b>	1 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	0,1 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,2 mM	ATP

## Material

---

<b>Polymerisationspuffer (Pyren-Aktin)</b>	1,5 M	KCl
	20 mM	MgCl <sub>2</sub>

### 2.1.4. Zellbiologie

<b>RPMI-Medium</b>	425 ml	in RPMI
	50 ml	10 % FCS
	5 ml	200 mM Glutamin
	5 ml	Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10.000 µg/ml)
	5 ml	NAA
	5 ml	1 M HEPES
	5 ml	100 mM Pyruvat
		für die Zellkultur zusätzlich Zugabe von 8 µl β- Mercaptoethanol auf 1 l → Sterilfiltration

<b>MACS-Puffer</b>	495,5 ml	PBS
	2 ml	0,5 M EDTA
	2,5 ml	10 % FCS

<b>RBC-Lyse-Puffer</b>	150 mM	NH <sub>4</sub> Cl
	1 mM	KHCO <sub>3</sub>
	0,1 mM	EDTA
		→ autoklavieren

### 2.1.5. Aptamer-Selektion

<b>5x TK Puffer</b>	0,2 M	Tris pH 7,9
<b>10x TBE-Puffer</b>	1 M	Tris pH 8,3
	0,83 M	Borsäure
	10 mM	EDTA

<b>Wasch-Puffer (Filterbindung)</b>	3 mM	MgCl <sub>2</sub> in PBS
<b>Membran-Puffer (Filterbindung)</b>	25 mM	Tris
	40 mM	6-Aminohexansäure

### 2.1.6. Wichtige kommerzielle Lösungen und Reagenzien

5x PCR-Puffer	Promega
Agarose	Invitrogen
Acrylamid-Lösung	AppliChem
Alkalische Phosphatase	NEB
β-Mercaptoethanol	Sigma
Bio-GelP6 DG	Bio-Rad
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
<i>Counting-Beads</i>	LifeTechnologies
Chloroform	Merck
Complete Protease Inhibitor	Roche
dNTPs	Promega
Ethanol	VWR
Ethidiumbromid	Bio-Rad
Glyzerin	Sigma
Glutathion-Beads	Invitrogen
Histofix	ROTH
Interleukin-7	Peptrotech
Isobutanol	AppliChem
Isopropanol	Merck
Klenow-Enzym	NEB
Latrunculin B	Molecular Probes
Methanol	Sigma
Phenol	Merck
Phusion DNA Polymerase	Thermo Scientific
RNasin	Promega
SDS-Lösung	AppliChem

## Material

---

Streptactin- <i>Beads</i>	IBA
T4-Ligase	NEB
T7-Polymerase	Stratagene
Tamoxifen	Sigma
<i>Taq</i> -Polymerase	Promega
TEMED	Sigma
Thrombin	SERVA

## 2.2. Kommerzielle Reagenziensätze (Kits)

FITC AnnexinV Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen
GeneJet Gel Extraction Kit	Fermentas
In-Fusion HD Cloning Kit	Clontech
MACS-Kits: CD4 (L3T4) MicroBeads, mouse CD8a (Ly-2) MicroBeads, mouse PanT Cell Isolation Kit II, mouse Dead Cell Removal Kit	Miltenyi
MACS-Säulen: MS Separation Columns LS Separation Columns	Miltenyi
MAXIScript T7 Transcription Kit	Life Technologies
MEGAScript T7 Transcription Kit	Life Technologies
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit	MACHERY-NAGEL
PureLink HiPure Plasmid Filter Midi Prep Kit	Life Technologies
Rotiphorese DNA-Sequenziersystem	ROTH
SuperScript II Reverse Transcriptase	Life Technologies
TOPO TA Cloning Kit	Life Technologies
Wizard Plus Minipreps DNA Purification System Kit	Promega

## 2.3. Allgemeine Labormaterialien

Agarose	Invitrogen
Verbandsgaze ( <i>Cheese-Cloth</i> )	Hartmann
Centricon-Röhrchen	Micon
Dialysesäulen (Maxi, Mega)	Novagen

Dialyseschläuche	Roth
Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Roth
Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml <i>Safeseal</i> )	Sarstedt
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml, 100 ml)	Sarstedt
Flaschenaufsatzfilter, Kombination aus Flaschenaufsatzfilter und Auffangflasche	VWR
Filconfilter (steril/unsteril)	BD
Glaswolle	Roth
Kanülen	BD
Küvetten (Plastik)	VWR
Magnetische Streptactin- <i>Beads</i>	IBA
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell
Nylomembran für Southern	GE Healthcare
Objektträger	VWR
Parafilm M	Bemis
Pasteurpipetten (Glas)	Brand
Pasteurpipetten (Plastik)	Falcon
PCR-Stripes	Bioplastics
Petrischalen	BD
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Falcon
Pipettenspitzen (normal, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (gestopft, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym
PVDF-Membran	Millipore
Röntgenfilme	Kodak, ThermoScientific
Säulen (Proteinaufreinigung)	Bio-Rad
Skalpelle	Bayha
Spritzen	BD
<i>well</i> -Platten (6 <i>well</i> , 12 <i>well</i> , 96 <i>well</i> )	Corning Life Science
<i>well</i> -Platten (schwarz, 96 <i>well</i> )	Costar
Whatmanpapier	Whatman International

## 2.4. Geräte im Labor

Agarose-Gelkammern	European Molecular Biology Laboratory
Äkta-FPLC	GE Healthcare
Brutschrank (Bakterienkultur)	Heraeus
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus
Dot-Blot-Einheit	Schleicher & Schuell
<i>Douncer</i>	Kontes
Durchflusszytometer Accuri C6	Accuri
Durchflusszytometer Canto	BD Biosciences
Eismaschine	Scotsman
Endlosrad	Schütt
Entwicklermaschine	AGFA
FACS Aria	BD Biosciences
Feinwaage	Kern
Film-Kassetten	Rego
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific
<i>Gel-Imager</i>	Bio-Rad
Gießstand SDS-Gele	Pharmacia Biotech
Glasplatten für SDS-Gele, Kämme	Hoefer
Heizblock	Grant
Motor für <i>Douncer</i> -Pistille	Bosch
Hybridisierungsöfen	GFL
Kühlschrank	Siemens
<i>LAS-Imager</i>	GE Healthcare
Magnetepipiständer	Invitrogen
Magnetrührer	Heidolph
Mikrowelle	Bosch
NanoVue Plus	GE Healthcare
Neubauer-Zählkammer	Brand
PCR-Maschinen	Bio-Rad, Peqlab, MJ Research

pH-Meter	InLab
Photometer	ThermoSpectronic
Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson
Pipettierhilfe	Brand
Schüttelinkubator (klein)	New Brunswick Scientific
Schüttelinkubator (groß)	Heraeus
SDS-Gelkammer	Hoefer
Semi-dry-Blotkammer	Bio-Rad
Spannungsgeräte für Agarosegelelektrophorese	Pharmacia
Spannungsgeräte für SDS-PAGE	Bio-Rad
Sterilfilter	Millipore
Thermo Varioskan Flash Fluorometer	Thermo Scientific
Ultraschallbad Transsonic T460	Elma
Ultraschallstab Sonifer B12	Branson
UV-Tisch	Bachofer
Vakuum-Pumpe	Vacuubrand
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage	Sartorius
Wasserbad	GFL
Wippe Duomax 1030	Heidolph
Tischzentrifuge Centrifuge 5415	Eppendorf
Kühl-Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Tischzentrifuge mit <i>Swingout</i> -Rotor 5417 R	Eppendorf
Tischzentrifuge groß Megafuge 10R	Heraeus
Tischzentrifuge groß <i>Swingout</i> -Rotor Multifuge 3 L-R	Heraeus
Standzentrifuge J2-21	Beckmann
Standzentrifuge J2-MC	Beckmann
Tischultrazentrifuge Optima MAX-XP	Beckmann
Standultrazentrifuge L8-70	Beckmann

## 2.5. Nukleinsäuren

### 2.5.1. Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Sie wurden im lyophilisierten Zustand geliefert und in MilliQ-Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Primer-Name	Sequenz (5'→3')	PCR-Programm
COIN2-5'a	CTGGAAGGGTTGTTACAACCCTGG	Cof1-PCR
COINSMA-3'	CGCTGGACCAGAGCACGCGGCATC	
cofNTS-3'a	CATGAAGGTTGCAAGTCCTCAAC	
Ala-3'	GATTTGTCCCTCAGGCCGCC	Ala-PCR
Cof1 1-250-5'	CTTGGTCTCATAGGTTG	
Asp-3'	GATTTGTCCCTCAGGCCGAC	Asp-PCR
Cof1 1-250-5'	CTTGGTCTCATAGGTTG	
Cre1	GCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGA	Cre-PCR
Cre2	GTGGCAGATGGCGCGGCAACACCATT	
Lck-Cre FWD	ATGGTGCCCAAGAAGAG	Lck-Cre-PCR
Lck-Cre REV	CAGGTGCTGTTGGATGG	
Rosa26_FW	AAAGTCGCTCTGATGTGTTAT	Rosa26-CreER <sup>T2</sup> -PCR
Rosa26_WT-RV	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	
Rosa26_cre-RV	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC	
WT Xba sense	TTTTGGAGGCAGGAAGCACTTG	Rosy- Genotypisierungs-PCR
WT Xba asense	GAAGGAGCGGGAGAAATGGATA	
SA-1as	GACATCATCAAGGAAACCCTGGACT	
Sas	GGTTGAGGACAAACTCTTCGC	Rosy- Rekombinations-PCR
PGKas	CTACCCGCTTCCATTGCTCAG	
YFPas	CTCGTTGGGGTCTTTGCTCAG	
Aptamer for	ATAGCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGG AGG GAAGTCTACACT TT	Reverse Transkription / PCR-Amplifikation
Aptamer rev	AAGCTTCGTCAACTCCAGAAA	



for-Primer-Strep	CCCAGGCCTGGTACCTCTAGAGAGCTCCTCG	Subklonierung Strep-Tag
	AGAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCG	
rev-Primer-Strep	CCCGAATTCCCGCCGCGCTTAATGCGCCG	
for-Primer-Cof1	CCCCATATGGCCTCTGGTGTGGCTGTC	Subklonierung
rev-Primer-Cof1	GGGCTCGAGCAAAGGCTTGCCCTCCAGGGA	Cofilin1
Infusion-ADF-for-Primer	AAGGAGATATACATATGGCCTCAGGAGTTC	Subklonierung ADF
Infusion-ADF-rev-Primer	TCCAAGCGCTCTCGAGCACAGGGGATCCTTC	
	AAAGG	

### 2.5.2. Southernblot-Hybridisierungssonden

Name	Beschreibung	Bindungsstelle
p1.0N <sub>6</sub> _pUC19	<i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI-Fragment	5'-UTR-Region des Cofilin1-Gens

### 2.5.3. Vektoren und rekombinante Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pGEX-2T-Cofilin1-WT	Expressionsvektor für das Fusionsprotein GST-Cofilin1-WT, IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen	Christine Gurniak
pGEX-2T-Cofilin1-Ala	Expressionsvektor für das Fusionsprotein GST-Cofilin1-Ala, IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen	Christine Gurniak

## Material

pGEX-2T-Cofilin1-Asp	Expressionsvektor für das Fusionsprotein GST-Cofilin1-Asp, IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen	Christine Gurniak
pGEX-2T-Cofilin2	Expressionsvektor für das Fusionsprotein GST-Cofilin2-WT, IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen	Christine Gurniak
pGEX-2T-ADF	Expressionsvektor für das Fusionsprotein GST-ADF-WT, IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen	Christine Gurniak
pASK-IBA43plus	Expressionsvektor, Strep-Tag II, 6xHistidin-Tag, Ampizillin-Resistenzgen	IBA
pMW172	Vektor für die Expression von Aktinbindeproteinen, IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen	Labor AG Witke
pMW172-Strep-Tag	Vektor für die Expression von Aktinbindeproteinen, Strep-Tag II, IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen	Julia Hecker
pMW172-Cofilin1-Strep-Tag	Expressionsvektor für das Fusionsprotein Cofilin1-Strep-Tag II, IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen	Julia Hecker

Material			
pMW172-ADF-Strep-Tag	Expressionsvektor für das Fusionsprotein ADF-Strep-Tag II, IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen	Julia Hecker	

## 2.6. Antikörper

### 2.6.1. Primäre Antikörper

Name	Antigen	Antikörpertyp	Spezies	Verdünnung	Hersteller
KG60	Cofilin1	polyklonal	Kaninchen	1:500	Labor AG Witke
KG40	Cofilin1 Cofilin2	polyklonal	Kaninchen	1:500	Labor AG Witke
FHU1	Cofilin2	polyklonal	Kaninchen	1:500	Labor AG Witke
7D10	ADF	monoklonal	Maus	1:5	Labor AG Witke
GAPDH	GAPDH	monoklonal	Maus	1:10.000	Calbiochem

### 2.6.2. Sekundäre Antikörper

Antigen	Antikörpertyp	Spezies	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen IgG	polyklonal	Ziege	Peroxidase	1:1000	Pierce
Maus IgG	polyklonal	Ziege	Peroxidase	1:1000	Pierce

### 2.6.3. FACS-Antikörper

Antigen	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
CD3ε	145-2C11	APC	1:100	eBioscience
CD4	RM4-5	eF450	1:200	eBioscience
		PerCP-e710	1:100	eBioscience

## Material

		APC	1:100	eBioscience
		BV650	1:200	BioLegend
CD8a	53-6.7	FITC	1:100	eBioscience
		PE	1:100	eBioscience
		PE-Cy7	1:300	eBioscience
CD19	1D3	PE	1:100	eBioscience
CD24	M1/16	APC	1:200	eBioscience
		PE	1:100	Pharmingen
CD25	PC61.5	APC	1:200	eBioscience
CD44	IM7	PerCP-Cy5.5	1:200	BioLegend
CD62L	MEL-14	e450	1:200	eBioscience
		PerCP-Cy5.5	1:200	eBioscience
CD69	H1.2F3	PE	1:100-200	PharMingen
Ki-67	SolA15	Alexa F647	1:200	eBioscience
TCR $\beta$	H57-597	APC	1:100	eBioscience
		PE-Cy7	1:200	eBioscience
Qa2	69H-9-9	FITC	1:100	eBioscience

### 2.6.4. Antikörper für die Aktivierungsversuche mit T-Zellen

Antigen	Endkonzentration	Referenz
CD3	5 $\mu$ g/ml	Labor AG Knolle
CD28	1 $\mu$ g/ml	Labor AG Knolle

### 2.6.5. FACS-Farbstoffe

Name	Beschreibung	Verdünnung	Hersteller
7AAD	Interkaliert in die DNA	1:100	Pharmingen
LIVE/DEAD-near-IR fluorescent	Lebend-Tot-Färbung	1:1000	LifeTechnologies
DNaseI-Alexa-488	Bindet an G-Aktin	1:200	Merck
Phalloidin-Alexa- 680	Bindet an F-Aktin	1:100	Merck

## 2.7. Mauslinien

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
C57BL/6	Inzuchtausstamm mit schwarzer Fellfarbe für Züchtungen und Rückkreuzungen	Charles River, eigene Zucht
Cofilin1 <sup>fl/fl</sup>	Transgene Mauslinie, in der das Exon 2 des Cofilin1-Gens von loxP-Stellen flankiert ist	(GURNIAK ET AL., 2005)
Cofilin1 <sup>Ala/+</sup>	Transgene Mauslinie, in der im Cofilin1-Protein die Aminosäure Serin3 gegen Alanin getauscht ist, heterozygot	Christine Gurniak
Cofilin1 <sup>Asp/+</sup>	Transgene Mauslinie, in der im Cofilin1-Protein die Aminosäure Serin3 gegen Aspartet getauscht ist, heterozygot	Christine Gurniak
distalLck-Cre	Transgene Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des distalLck-Promotors exprimiert	(ZHANG et al., 2005)
CD4-Cre	Transgene Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CD4-Promotors exprimiert	(WOLFER et al., 2001)

## Material

Rosa26-CreER <sup>T2</sup>	Transgene Mauslinie, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des ROSA26-Promotors enthält	(BADEA et al., 2003)
R26R-EYFP	Transgene Mauslinie, die eine von loxP-Stellen flankierte Stopp-Kassette vor der kodierenden Region des eYFP-Gens unter Kontrolle des ROSA26-Promotors enthält	(SRINIVAS et al., 2001)

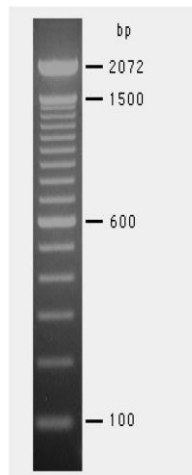
## 2.8. Bakterienstämme

<i>E.coli</i> -Stamm	Anmerkung
DH5α	Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide
XL1-blue	Herstellung und Vermehrung rekombinanter Plasmide
BL21DE3	Überexpression rekombinanter Plasmide

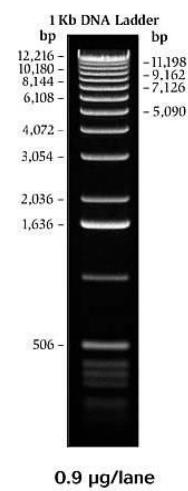
## 2.9. Größenstandards

### 2.9.1. DNA-Größenstandards

100 bp DNA-Größenstandard  
(Invitrogen)

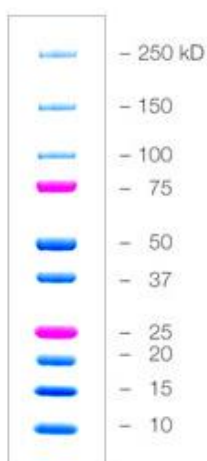


1 kb DNA-Größenstandard  
(Invitrogen)

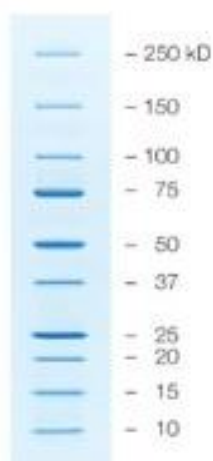


### 2.9.2. Protein-Größenstandards

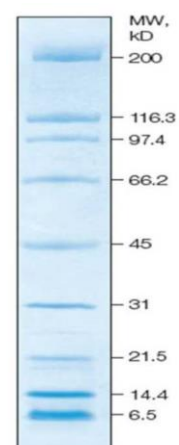
Precision Plus Protein  
Standards – Dual Color  
(Bio-Rad)



Precision Plus Protein  
Standards – Unstained  
(Bio-Rad)



Broad Range Standard  
(Bio-Rad)



## 2.10. Software

Adobe Illustrator

Adobe Photoshop

BD Accuri C6 Software

Clone Manager

Enhance

FlowJo

Mausoleum (H.-E. Stöffler)

MS Office 2010

Multi Gauge

Radames (H.-E. Stöffler)



## 3. Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurde für die Zentrifugation der Proben die Eppendorf-Tischzentrifuge oder die Eppendorf-Kühl-Tischzentrifuge verwendet.

### 3.1. Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1. Nucleinsäureanalytik

##### 3.1.1.1. Isolierung genomischer DNA aus murinen Schwanzbiopsien

Zur Isolation von Schwanzspitzen-DNA gibt es zwei verschiedene Methoden, die sich im Aufwand der Präparation und in der Reinheit der erhaltenen DNA unterscheiden.

Um den Genotyp der Mäuse bestimmen zu können, benötigt man die DNA in großem Durchsatz. Dazu werden von 3-4 Wochen alten Mäusen ca. 2 mm lange Schwanzbiopsien genommen, in 200 µl TENT-Puffer überführt und ÜN bei 55°C im Heizblock lysiert. Am nächsten Tag werden die Proben für 10 min bei 95°C aufgeköcht, stark gevortext und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Zellrückstände, Haare und Knochen zu pelletieren. Der Überstand kann direkt in eine Genotypisierungs-PCR eingesetzt werden.

Für die Analyse der genomischen DNA mittels Southernblot benötigt man einen hohen Reinheitsgrad. Hierzu werden ca. 5 mm lange Schwanzbiopsien in 500 µl Laird-Puffer (LAIRD et al., 1991) aufgenommen und ÜN bei 55°C im Heizblock inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird das erhaltene Lysat kurz gevortext und dann für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versehen und für ca. 3 h auf dem Endlosrad inkubiert. Anschließend wird die präzipitierte DNA mit Hilfe einer gebogenen Glaspasteurpipette gefischt und die DNA-Flocke zunächst in 70 %igem und anschließend absolutem Ethanol gewaschen und entwässert. Zuletzt wird die DNA bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen. Die isolierte DNA kann bei RT oder 4°C gelagert werden.

##### 3.1.1.2. Isolierung genomischer DNA aus Zellen muriner Gewebe

Die Isolierung genomischer DNA aus Zellen murinen Gewebes erfolgt analog zu der Gewinnung der DNA aus Schwanzspitzen. Die aus lymphatischem Gewebe gewonnenen

Zellen (vgl. Abschnitt 3.3.1) werden durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm und 4°C im *Swingout*-Rotor (Tischzentrifuge) pelletiert, das erhaltene Pellet in einem Volumen 30 µl PBS aufgenommen und je nach Verwendungszweck der DNA mit Tent- bzw. Laird-Puffer versehen. Alle weiteren Schritte erfolgen wie in Abschnitt 3.1.1.1 beschrieben.

### **3.1.1.3. Phenol-Chloroform-Extraktion**

Um Kontaminationen durch Proteine in Nukleinsäurelösungen zu entfernen, bedient man sich der Phenol-Chloroform-Extraktion. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit von Nukleinsäuren und Proteinen in der Emulsion aus Phenol und Chloroform.

Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion gibt man 1 Vol. Phenol-Chloroform (1:1) zur Probe, mischt diese gut und zentrifugiert für 10 min bei 13.000 rpm. Anschließend wird die obere wässrige Phase, in welcher sich die Nukleinsäuren befinden, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die untere organische Phase mit den Proteinen zurückgelassen. Durch eine anschließende Alkoholfällung werden Phenolreste aus der Lösung entfernt. Dazu wird die Probe mit 1 Vol. Isopropanol versetzt, gemischt und für 10 min bei -20°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C wird der Überstand abgenommen und das erhaltene Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Hierfür wird das Pellet mit 500 µl Alkohol versehen und anschließend für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wird durch Zugabe von absolutem Ethanol wiederholt. Zuletzt wird das Pellet trocknen gelassen und am Ende in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

### **3.1.1.4. Natriumacetat-Fällung**

Die Natriumacetat-Fällung ist eine weitere Methode, zur Konzentrierung und Reinigung von Nukleinsäurelösungen. Hierbei wird die Probe mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 4,8 versetzt und weiterhin 2-2,5 Vol. absoluter Ethanol hinzugefügt. Es folgt eine Inkubation für 10 min bei -20°C und eine Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm. Anschließend wird das erhaltene Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen (vgl. Abschnitt 3.1.1.3), getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

### **3.1.1.5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode zur schnellen, exponentiellen Amplifikation von DNA-Bereichen (MULLIS, FALOONA, 1987). Dazu

benötigt man eine Information über die Sequenz, die die zu amplifizierenden Bereiche flankiert, um dementsprechend zwei Oligonukleotid-Primer ableiten zu können. Diese binden nach Denaturierung der DNA bei 95°C an die entsprechenden beiden komplementären DNA-Einzelstränge. Für diesen Anlagerungsschritt wird die Reaktionstemperatur auf durchschnittlich 55°C wieder abgesenkt. Eine hitzestabile DNA-Polymerase, wie z.B. die *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* mit einem Temperaturoptimum bei 72°C, synthetisiert, ausgehend von den 3'-OH-Enden der beiden Primermoleküle zwei zur Ausgangsmatrize komplementäre DNA-Stränge. Diese dienen nach erneuter Denaturierung selbst als Matrize. Der PCR-Zyklus bestehend aus Denaturierung, Anlagerung und Synthese wird 35-40 fach wiederholt und führt zu einer selektiven Vervielfältigung des durch die Oligonukleotid-Primer flankierten DNA-Bereichs.

#### 3.1.1.5.1. Genotypisierungs-PCRs zur Charakterisierung transgener Mäuse

Wenn nicht anders angegeben, werden Reagenzien folgender Konzentrationen verwendet: MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTPs (je 2,5 mM) und Primer (5 pmol/μl). Für Genotypisierungs-PCRs wird die *Taq*-Polymerase (5 U/μl) eingesetzt.

#### Standard-PCR

19 μl Reaktionsansatz + 1 μl DNA		Programm:			
		Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
8,87 μl	H <sub>2</sub> O	1	94°C	2 min	1
4,0 μl	5x PCR-Puffer	2	94°C	30 s	
1,5 μl	MgCl <sub>2</sub>	3	55°C	40 s	35
1,5 μl	dNTPs	4	72°C	40 s	
1,5 μl	Primer 1	5	72°C	5 min	1
1,5 μl	Primer 2				
0,13 μl	<i>Taq</i> -Polymerase				

## Methoden

### Cof1-PCR

19 µl Reaktionsansatz + 1 µl DNA	Programm:			
	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
9,37 µl H <sub>2</sub> O	1	94°C	2 min	1
4,0 µl 5x PCR-Puffer	2	94°C	30 s	35
1,5 µl MgCl <sub>2</sub>	3	58°C	30 s	
1,5 µl dNTPs	4	68°C	40 s	
1,5 µl COIN2-5'a	5	68°C	5 min	1
0,5 µl COINSMA-3'				
0,5 µl cofNTS-3'a				
0,13 µl <i>Taq</i> -Polymerase				

WT-Allel: 380 bp

Cof1-fl-Allel: 470 bp

Cof1-del-Allel: 170 bp

### Ala-PCR

19 µl Reaktionsansatz + 1 µl DNA	Programm:			
	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
9,17 µl H <sub>2</sub> O	1	94°C	2 min	1
4,0 µl 5x PCR-Puffer	2	94°C	30 s	35
1,2 µl MgCl <sub>2</sub>	3	55°C	40 s	
1,5 µl dNTPs	4	72°C	40 s	
1,5 µl Ala-3'	5	72°C	5 min	1
1,5 µl Cof1 1-250-5'				
0,13 µl <i>Taq</i> -Polymerase				

Ala-Allel: 270 bp

**Asp-PCR**

19 µl Reaktionsansatz + 1 µl DNA	Programm:			
	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
8,87 µl H <sub>2</sub> O	1	94°C	2 min	1
4,0 µl 5x PCR-Puffer	2	94°C	30 s	
1,5 µl MgCl <sub>2</sub>	3	55°C	40 s	35
1,5 µl dNTPs	4	72°C	40 s	
1,5 µl Asp-3'	5	72°C	5 min	1
1,5 µl Cof1 1-250-5'				
0,13 µl <i>Taq</i> -Polymerase				

Asp-Allel: 270 bp

**Cre-PCR**

19 µl Reaktionsansatz + 1 µl DNA	Programm:			
	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
6,1 µl H <sub>2</sub> O	1	98°C	2 min	1
4,0 µl 5x PCR-Puffer	2	98°C	30 s	
1,2 µl MgCl <sub>2</sub>	3	58°C	30 s	35
1,5 µl dNTPs	4	72°C	40 s	
1,5 µl Cre1	5	72°C	5 min	1
1,5 µl Cre2				
0,13 µl <i>Taq</i> -Polymerase				

Cre-Allel: 600 bp

## Methoden

### Lck-Cre-PCR

19 µl Reaktionsansatz + 1 µl DNA		Programm:			
		Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
9,17 µl	H <sub>2</sub> O	1	94°C	2 min	1
4,0 µl	5x PCR-Puffer	2	94°C	30 s	
1,2 µl	MgCl <sub>2</sub>	3	62°C	40 s	35
1,5 µl	dNTPs	4	72°C	40 s	
1,5 µl	Lck-Cre FWD	5	72°C	5 min	1
1,5 µl	Lck-Cre REV				
0,13 µl	Taq-Polymerase				

Lck-Cre-Allel: 300 bp

### Rosa26-CreER<sup>T2</sup>-PCR

19 µl Reaktionsansatz + 1 µl DNA		Programm:			
		Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
9,5 µl	H <sub>2</sub> O	1	98°C	2 min	1
4,0 µl	5x PCR-Puffer	2	96°C	30 s	
1,2 µl	MgCl <sub>2</sub>	3	60°C	1 min	30
1,6 µl	dNTPs	4	72°C	30 s	
1,5 µl	Rosa26_FW	5	72°C	5 min	1
0,5 µl	Rosa26_WT_RV				
0,5 µl	Rosa26_Cre_RV				
0,2 µl	Taq-Polymerase				

WT-Allel: 600 bp

Cre-Allel: 300 bp

**Rosy-Genotypisierungs-PCR**

24 µl Reaktionsansatz + 1 µl DNA		Programm:			
		Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
13,5 µl	H <sub>2</sub> O	1	94°C	1 min	1
5,0 µl	5x PCR-Puffer	2	94°C	45 s	
1,8 µl	MgCl <sub>2</sub>	3	67°C	30 s	35
1,0 µl	dNTPs	4	72°C	40 s	
1,0 µl	WT Xba sense	5	72°C	5 min	1
1,0 µl	WT Xba asense				
0,5 µl	SA-1as				
0,2 µl	Taq-Polymerase				

In diese PCR werden die Primer mit einer Konzentration von 25 pmol/µl eingesetzt.

WT-Allel: 650 bp

Transgen-Allel: 290 bp

**Rosy-Rekombinations-PCR**

24 µl Reaktionsansatz + 1,5 µl DNA		Programm:			
		Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
12,8 µl	H <sub>2</sub> O	1	94°C	1 min	1
5,0 µl	5x PCR-Puffer	2	94°C	45 s	
2,0 µl	MgCl <sub>2</sub>	3	67°C	30 s	25
1,0 µl	dNTPs	4	72°C	40 s	
1,0 µl	SAs	5	72°C	10 min	1
1,0 µl	pGKas				
1,0 µl	YFPas				
0,2 µl	Taq-Polymerase				

In diese PCR werden die Primer mit einer Konzentration von 25 pmol/µl eingesetzt.

rekombiniertes Allel: 829 bp

nicht rekombiniertes Allel: 440 bp

### 3.1.1.6. Aufreinigung und Konzentrierung von PCR-Produkten

Sollen PCR-Produkte z.B. als Ausgangsprodukt für eine Klonierung dienen, müssen die während der PCR benötigten Primer, dNTPs, die Polymerase etc. entfernt und die erhaltene DNA umgepuffert werden. Dies wird mit dem *GeneJET Gel Extraction Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip der Aufreinigung besteht darin, dass DNA mit chaotropen Salzen versetzt spezifisch an Silikamembranen bindet. Diese Membran befindet sich in den zum Kit gehörigen Säulen für die Aufreinigung. Nach Waschen der an die Membran gebundenen DNA kann diese mit Wasser oder TE-Puffer eluiert werden.

Neben der Aufreinigung ist mit dieser Methode auch eine Konzentrierung der PCR-Produkte möglich, da die Elution der DNA in einem gewünschten Volumen erfolgen kann.

### 3.1.1.7. Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarosegel-Elektrophorese werden Nukleinsäuren in Abhängigkeit von ihrer Größe in einer Agarosematrix unter angelegter Spannung aufgetrennt. Aufgrund der negativen Ladung wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode. Diese Methode kann zur Auftrennung von DNA in einem Bereich zwischen 100 bp bis 20 kbp eingesetzt werden. Entsprechend der aufzutrennenden Fragmentgrößen werden Agarose-Konzentrationen zwischen 0,8-2,5 % gewählt. Die Agarose wird durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst, mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt und in einen Gelträger gegossen, wobei ein Kamm für die Bildung von Taschen sorgt. Nach Erkalten des Gels, werden die mit Ladepuffer versehenen DNA-Proben in die Taschen pipettiert und bei einer Spannung von 50-150 V aufgetrennt. Nach der Elektrophorese kann die DNA durch die Interkalation des Ethidiumbromids mit Hilfe von UV-Licht im *Gel-Imager* sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich mit dem ebenfalls aufgetragenen Größenstandard können die Fragmentgrößen der DNA bestimmt werden.

### 3.1.1.8. Elution von DNA aus Agarosegelen

Im Anschluss an die Auftrennung von DNA-Fragmenten im Zuge einer Agarosegel-Elektrophorese können die gewünschten Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Die Elution der DNA aus dem Agarosegel erfolgt mit dem *GeneJET Gel Extraction Kit*. Das Prinzip der Aufreinigung ist bereits in Abschnitt 3.1.1.6 beschrieben. Chaotrope Salze sorgen ebenfalls für das Auflösen von Agarose.



### 3.1.1.9. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

#### 3.1.1.9.1. Mini-Präparation

Die Mini-Präparation ist eine schnelle Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.

Bei der Mini-Präparation in Form der alkalischen Lyse erhält man einen Reinheitsgrad, der für die Identifikation rekombinanter Bakterienklone mittels Restriktionsspaltung ausreichend ist. Dazu werden 2 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien angeimpft und ÜN in einem Schüttelinkubator bei 250 rpm und 37°C inkubiert. Anschließend werden 1,5 ml der ÜN-Kultur in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 13.000 rpm zur Sedimentierung der Bakterien zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl alkalischer Lösung 1 resuspendiert. Danach werden 200 µl alkalische Lösung 2 hinzugefügt, durch Invertieren die Lösungen gemischt und für 5 min inkubiert. In diesem Schritt wird die Bakterienzellwand vollständig lysiert und es kommt zur Denaturierung der Plasmid-DNA, der genomischen DNA und der Proteine. Nach einer Zugabe von 150 µl alkalischer Lösung 3 werden die Proben für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Lösung 3 sorgt für eine Erniedrigung des pH-Werts und somit für eine Renaturierung der Plasmid-DNA, die während der Zentrifugation von der genomischen DNA und den Proteinen getrennt wird. Der erhaltene Überstand in welchem sich nun die Plasmid-DNA befindet, wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl absolutem Ethanol versetzt und zur Fällung der DNA 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und zum Waschen des DNA-Pellets 500 µl 70 %iges Ethanol hinzugefügt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm wird der Überstand entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Zum Schluss wird die DNA in 100 µl Wasser oder TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

Um im Zuge einer Mini-Präparation einen Reinheitsgrad der DNA zu erhalten, der für eine Sequenzierung ausreichend ist, verwendet man das *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System Kit* nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der reversiblen Bindung der DNA an ein bestimmtes Harz.

#### 3.1.1.9.2. Midi-Präparation

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA bedient man sich der Midi-Präparation. Diese erfolgt mit dem *PureLink HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit* nach Herstellerangaben. Das

Aufreinigungsprinzip beruht auf dem Prinzip des Anionenaustausches. Anionenaustauscher bestehen aus einer positiv geladenen Matrix an welche die DNA binden kann. Die Bindungsstärke von DNA, RNA und Proteinen ist unterschiedlich und zudem abhängig von pH-Wert und Ionenstärke des verwendeten Puffers, sodass selektiv eluiert werden kann. Der Anionenaustauscher befindet sich als Membran in einer Säule.

### **3.1.1.10. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Mit Hilfe von UV-Licht kann die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäuren anhand ihrer optischen Dichte bestimmt werden. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, während das der Proteine bei 280 nm liegt. Andere Kontaminationen, z.B. durch EDTA oder Phenol können bei einer Wellenlänge von 230 nm detektiert werden. Eine Absorptionseinheit entspricht bei einem Strahlengang von 1 cm Länge einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA bzw. 40 µg/ml für RNA. Zur Beurteilung der Reinheit der Lösung werden die Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  (Optimum: 1,8-2,0) bzw.  $OD_{260}/OD_{230}$  (Optimum: 2,0-2,2) ermittelt.

Das *NanoVue Plus Spectrophotometer* ist ein Gerät mit einer *drop-and-measure sample plate* auf die 1-2 µl einer Nukleinsäure-haltigen Lösung pipettiert und dann die Konzentration direkt vom Gerät ausgegeben wird.

### **3.1.1.11. Southernblot-Analyse**

Beim Southernblot wird die DNA nach Restriktionsspaltung (vgl. Abschnitt 3.1.2.1.1) durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, denaturiert und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Mit Hilfe radioaktiv markierter DNA-Sonden können DNA-Fragmente auf der Membran spezifisch nachgewiesen werden (SOUTHERN, 1975).

Nach der Aufreinigung genomischer DNA (vgl. Abschnitt 3.1.1.1, 3.1.1.2) werden 10-15 µg von dieser in einem Ansatz von 40 µl mit einem geeigneten Restriktionsenzym ÜN bei 37°C im Brutschrank verdaut. Dem Ansatz wird zusätzlich 1 µl 0,1 M Spermidin hinzugefügt, welches die DNA bindet und präzipitiert. Im nächsten Schritt werden die so entstandenen DNA-Fragmente über ein 0,8 %iges Agarosegel bei 20 V ÜN aufgetrennt (vgl. Abschnitt 3.1.1.7). Am darauf folgenden Tag wird das Gel zunächst mit Hilfe des *Gel-Imagers* dokumentiert. Anschließend wird es für 1 h in Denaturierungs-Puffer auf der Wippe inkubiert, um später ein Anlagern der Sonden an DNA-Einzelstränge zu ermöglichen. Nun kann der Blotaufbau erfolgen, wobei die Komponenten für den Transfer wie folgt

übereinander geschichtet werden: Gel mit der Oberseite nach unten, Nylonmembran, 2 Lagen Whatmanpapier, saugfähige Tücher, Gewicht. Der Transfer auf die Membran erfolgt ÜN von unten nach oben aus dem Gel in die Membran. Am nächsten Tag wird die Membran für 30 min in Neutralisierungs-Puffer auf der Wippe inkubiert. Zuletzt wird die Membran für 12 s im UV-Schrank behandelt, damit die DNA kovalent an die Membran bindet (*Cross-Linking*). Nun kann die Membran direkt für die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde weiterbehandelt oder gelagert werden.

Für die Herstellung der radioaktiv markierten Sonde werden 50 ng des entsprechenden ds-DNA-Fragments bei 95°C für 10 min denaturiert und anschließend sofort abgekühlt. Dann werden dem Gesamtansatz ( $\Sigma$  50  $\mu$ l) 10  $\mu$ l OLB (*Oligo Labeling Buffer*, ohne dGTP; Christine Gurniak), 2  $\mu$ l BSA (10 mg/ml), 3  $\mu$ l radioaktiv markiertes [ $\alpha^{32}$ P]-dGTP und 1  $\mu$ l Klenow-Enzym (1 U/ $\mu$ l) hinzugefügt und bei RT ÜN inkubiert. Die Aufreinigung der Sonde erfolgt über eine mit Bio-GelP6 DG befüllten Säule nach dem Prinzip der Größenausschluss-Chromatographie. Dem Reaktionsansatz werden dazu 150  $\mu$ l Stopp-Puffer hinzugefügt und dieses Gemisch dann auf die Säule gegeben. Bei der anschließenden Zentrifugation für 2 min bei 2000 rpm passiert die radioaktiv markierte DNA das Säulenmaterial während die kleinen freien dNTPs davon zurück gehalten werden. Die radioaktiv markierte Sonde kann nun nach einer Denaturierung für 10 min bei 95°C direkt für die Hybridisierung eingesetzt werden.

Zunächst wird die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt, dann zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in einer Hybridisierungsröhre mit 10 ml vorgewärmtem Hybridisierungspuffer versehen und 1 h bei 65°C im Hybridisierungsofen vorhybridisiert. Die eigentliche Hybridisierungsreaktion erfolgt nach Zugabe der radioaktiv markierten DNA-Sonde ÜN bei 65°C im Ofen. Nach der Hybridisierung werden überschüssige, unspezifisch haftende Sondenmoleküle durch mehrmaliges Waschen mit Wasch-Puffer bei 65°C im Ofen entfernt. Die Radioaktivität auf der Membran wird nach jedem Waschschrift mit dem Handmessgerät überprüft. Zum Schluss wird die getrocknete Membran in Folie eingeschlagen, in eine Filmkassette eingelegt und in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition erfolgt bei -80°C und ist in ihrer Dauer abhängig von der Signalstärke. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgt in einer Entwicklermaschine.

### 3.1.2. Techniken bei der Herstellung rekombinanter Plasmide

#### 3.1.2.1. Modifikation von DNA-Molekülen

##### 3.1.2.1.1. Spaltung doppelsträngiger Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung doppelsträngiger Nukleinsäuren verwendet man Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Sie erkennen spezifische, palindromische Nukleotidsequenzen zwischen 4-8 bp Länge innerhalb derer sie schneiden. Durch die Restriktion entstehen je nach Eigenschaft des verwendeten Enzyms glatte Doppelstrangenden oder kohäsive Enden mit einem 3'- oder 5'-Überhang.

Die Restriktionsendonukleasen werden nach den Herstellerangaben verwendet. In einen Restriktionsansatz werden ca. 1-2 µg DNA eingesetzt. Bei einer gleichzeitigen Spaltung einer DNA-Probe mit mehreren Enzymen muss darauf geachtet werden, dass die Puffer kompatibel sind.

##### 3.1.2.1.2. Dephosphorylierung von Vektorenden

Nach der Spaltung von Nukleinsäuren mittels Restriktionsendonukleasen befindet sich am 5'-Ende der DNA eine Phosphatgruppe. Diese kann dazu führen, dass es während der Ligation (siehe Abschnitt 3.1.2.1.3) zu einer Rezirkularisierung zum Ausgangsvektor ohne Aufnahme des einzuklonierenden Fragments kommt. Um dieses Problem zu umgehen, werden die freien 5'-Phosphatenden mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase entfernt.

Die alkalische Phosphatase wird nach Angaben des Herstellers verwendet.

##### 3.1.2.1.3. Ligation doppelsträngiger Nukleinsäuren

Bei der Ligation doppelsträngiger Nukleinsäuren wird unter ATP-Verbrauch das freie 5'-Phosphatende des einen DNA-Strangs über eine Phosphodiesterbindung mit dem 3'-Hydroxylende des anderen Strangs verknüpft. Mit dieser Reaktion, die von der T4-DNA-Ligase katalysiert wird, können Insert-DNA und Vektorrückgrat miteinander verbunden werden.

In einem Ligationsansatz werden 1 µl Vektor-DNA und 7 µl Insert-DNA mit 1 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase versetzt. Die Inkubation erfolgt ÜN bei RT. Dabei sollte 3-5mal mehr Insert- als Vektor-DNA eingesetzt werden.

### 3.1.2.2. Transformation

Unter Transformation versteht man die Aufnahme zirkulärer, doppelsträngiger DNA in prokaryotische Zellen. Das Einbringen modifizierter Plasmide in Bakterienzellen ermöglicht zum einen die Vervielfältigung modifizierter DNA-Moleküle, aber auch die Überexpression von Proteinen.

#### 3.1.2.2.1. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien werden 50 ml LB-Medium mit 0,5 ml einer ÜN-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft. Diese Hauptkultur wird in einem Schüttelinkubator bei 250 rpm und 37°C inkubiert bis die Suspension eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 erreicht hat. Anschließend werden die Bakterienzellen auf Eis abgekühlt und 10 min bei 3000 rpm (Standzentrifuge) abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen werden in 20 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm (Standzentrifuge) werden die Bakterienzellen in 3 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Zuletzt erfolgt eine Inkubation der Zellen auf Eis für 1 h. Die nun kompetenten Zellen werden nach Zugabe von 20 % Glycerin in Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

#### 3.1.2.2.2. Chemische Transformation

Für die Transformation werden 100 µl auf Eis aufgetauter, chemisch kompetenter Bakterien zu dem zu transformierenden Ligationsansatz gegeben, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach führt ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s zur Aufnahme der DNA in die Bakterien. Anschließend wird der Ansatz sofort für 5 min auf Eis abgekühlt. Daraufhin erfolgt die Zugabe von 1 ml LB<sup>0</sup>-Medium und eine Inkubation für 30 min bei 37°C und 250 rpm im Schüttelinkubator. Diese Inkubationszeit ermöglicht die Ausprägung von plasmidkodierten Resistenzeigenschaften. Zuletzt werden die Bakterien auf antibiotikumhaltige Agarplatten ausgestrichen und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### 3.1.2.3. Colony-PCR

Eine erfolgreiche Transformation kann durch entsprechende Testverdaus mittels Restriktionsendonukleasen erfolgen (vgl. Abschnitt 3.1.2.1.1). Die Colony-PCR stellt eine schnellere Methode zur Überprüfung dar. Hierbei werden die Kolonien von der Agarplatte gepickt und jeweils in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Um die Bakterien der entsprechenden

Kolonie weiterhin auf einer Platten kultivieren zu können, wird nach dem Picken eine Replikaplatte angeimpft bevor die Kolonie in Wasser resuspendiert wird. Anschließend wird die erhaltene Bakteriensuspension für 15 min bei 95°C im Heizblock aufgeköcht und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nun können 1-2 µl des Überstands in eine PCR eingesetzt werden.

### **3.1.2.4. DNA-Sequenzierung**

Zur Bestätigung der Herstellung des gewünschten Plasmids wird die DNA extern zum Sequenzieren gegeben.

### **3.1.2.5. Kryokonservierung von Bakterien**

Zur Langzeitkonservierung von transformierten Bakterien werden Glycerinkulturen angelegt. Dazu werden 750 µl einer Bakterienkultur mit 250 µl Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Kultur wird dann bei -80°C gelagert.

### **3.1.2.6. Sonderformen bei der Herstellung rekombinanter Plasmide**

#### **3.1.2.6.1. TA-Klonierung**

Die TA-Klonierung ist eine schnelle Methode zur Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor ohne Verwendung von Restriktionsendonukleasen. Dabei macht man sich die Tatsache zur Nutze, dass die *Taq*-Polymerase am Ende ihres Produkts immer einen unspezifischen Überhang in Form eines Adenosins hinterlässt. Darüber lässt sich das PCR-Produkt ohne Restriktionsspaltung direkt in einen Vektor mit Thymidin-Überhang ligieren.

Zur Klonierung von PCR-Produkten wird das *TOPO TA Cloning Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Besonders ist bei diesem Vektor weiterhin, dass keine Ligase erforderlich ist. Stattdessen befindet sich an den beiden Enden des TA-Vektors jeweils eine Topoisomerase I, die laut Herstellerangaben innerhalb von 5 min die Ligationsreaktion durchführt.

#### **3.1.2.6.2. In-Fusion-Klonierung**

Für komplizierte Klonierungen, z.B. aufgrund großer zu klonierender Fragmente, ist die In-Fusion-Klonierung die Methode der Wahl. Es ist ein Ligase-freies Klonierungssystem, das sich stattdessen den Prinzipien der Rekombination bedient. Das In-Fusion-Enzym ist eine Rekombinase, die 15 bp-Überhänge erkennt und miteinander fusioniert. Dieser essentielle 15 bp-Überhang, der zwischen zu klonierendem Insert und Vektor identisch sein muss, kann

durch das Design entsprechender Primer für die Amplifikation des Inserts hergestellt werden.

Für die In-Fusion-Klonierung wird das *In-Fusion HD Cloning Kit* nach Herstellerangaben verwendet.

## **3.2. Biochemische Methoden**

### **3.2.1. Proteinanalytik**

#### **3.2.1.1. Proteinextraktionen aus murinen Geweben**

Zur Proteinextraktion aus murinem Gewebe werden die Organe, die der Maus entnommen wurden, zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese können dann entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert werden.

Bei der eigentlichen Extraktion wird das gefrorene Organ in einen *Douncer* überführt, mit einem entsprechenden, ca. 3-5fachen Volumen des Organs PEB-Puffer versehen und homogenisiert, wobei alles auf Eis erfolgt. Anschließend werden 1000 µl des Homogenisats in ein Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 16.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wird wiederum in ein Ultrazentrifugenröhrchen transferiert und für 30 min bei 47.900 rpm und 4°C zentrifugiert (Tisch-Ultrazentrifuge; Rotor: TLA-120.2). Das ultra-zentrifugierte als auch das Lysat nach der ersten Zentrifugation können in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert werden.

Für die Analyse der Proteinlysate werden diese mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95°C aufgekocht und 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Die so behandelten Proben können bei -20°C gelagert werden.

#### **3.2.1.2. Proteinextraktionen aus Zellen muriner Gewebe**

Bei der Proteinextraktion aus Zellen muriner Gewebe wird die aus lymphatischen Organen gewonnene Einzelzellsuspension für 10 min bei 1000 rpm und 4°C im *Swingout*-Rotor (Tischzentrifuge) pelletiert, das erhaltene Pellet in einem entsprechenden Volumen PBS aufgenommen und mit SDS-Probenpuffer versehen. Dann wird die Probe wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben, weiterbehandelt.

### 3.2.1.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford-Assay)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration bedient man sich der Methode nach Bradford. Sie basiert darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 in saurem Milieu mit unpolaren und kationischen Seitenketten der Proteine Komplexe bildet, wobei sich dessen Absorption von 465 nm nach 595 nm verschiebt (BRADFORD, 1976). Dabei verhält sich die Absorption proportional zur Proteinkonzentration in der Probe. Um aus der gemessenen Absorption der Probe die Proteinkonzentration zu ermitteln, wird im Vorfeld eine Eichreihe mit BSA-Proteinproben bekannter Konzentration aufgenommen.

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung werden 3 µl Probe mit 47 µl H<sub>2</sub>O und 950 µl Bradford-Reagenz versehen, die Probe in eine Küvette überführt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer bestimmt. Die Proben werden immer gegen eine entsprechende Referenzprobe als Leerwert gemessen, wobei statt 3 µl Probe 3 µl der Lösung vermessen werden in der die Probe gelöst ist.

### 3.2.1.4. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das essentielle Reagenz bei dieser Methode ist Natriumdodecylsulfat (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS), das als anionisches Detergenz einerseits Proteine denaturiert und andererseits maskiert, sodass die Polypeptidketten alle eine negative Ladung tragen und somit unabhängig von ihrer Eigenladung im elektrischen Feld aufgetrennt werden können. Es handelt sich um eine diskontinuierliche Elektrophorese, da die Proteine zunächst im niederprozentigen Sammelgel gesammelt und anschließend im höherprozentigen Trenngel aufgetrennt werden.

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (15 %)
Acrylamidlösung (30 %)	4,8 ml	25 ml
2 M Tris-HCl pH 8,8	-	9,4 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	7,5 ml	-
SDS (10 %)	0,3 ml	0,5 ml
H <sub>2</sub> O	17,4 ml	15 ml
APS (10 %)	0,15 ml	0,24 ml
TEMED	0,03 ml	0,045 ml



Die Gele werden in einem speziellen Gießstand zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zur Bildung von Taschen werden Kämme eingesetzt. Nachdem das Gel polymerisiert ist, wird es in eine mit SDS-Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer geklemmt und der Kamm entfernt. Dann werden die, wie in Abschnitt 3.2.1.1 und 3.2.1.2 beschrieben, behandelten Proben in die Taschen geladen. Der Gellauf erfolgt im Sammelgel bei 80 V, während die Auftrennung im Trenngel bei 100 V durchgeführt wird.

#### **3.2.1.5. Coomassie-Färbung**

Zur unspezifischen Anfärbung von Proteinen im Gel, entweder direkt nach SDS-PAGE oder im Anschluss an den Westernblot-Transfer (vgl. Abschnitt 3.2.1.6), bedient man sich der Coomassie-Färbung. Der blaue Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 lagert sich, wie bereits in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben, an Proteine an und kann somit dazu verwendet werden, diese sichtbar zu machen und optisch Proteinkonzentrationen abzuschätzen.

Für die Färbung wird das Gel nach dem Lauf in Coomassie-Färbelösung für 30 min auf der Wippe gefärbt, anschließend in Coomassie-Entfärbelösung überführt und auf der Wippe inkubiert bis die Hintergrundfärbung entfernt ist.

#### **3.2.1.6. Westernblot-Analyse**

Beim Westernblot werden die zuvor bei der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen (Towbin et al., 1979). Hier verwendet man die Semi-dry-Methode, bei welcher die Proteine aufgrund ihrer negativen Maskierung durch das SDS im elektrischen Feld zwischen zwei Plattenelektroden zur Anode wandern und dabei auf die Membran übertragen werden. Mit Hilfe von Antikörpern lassen sich die Proteine dann auf der Membran spezifisch nachweisen.

Für einen Westernblot werden 0,5-5 µg extrahiertes Protein im Zuge einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Abschnitt 3.2.1.4). Im Anschluss daran wird das Gel als auch die zuvor in Methanol aktivierte PVDF-Membran in kaltem Towbin-Transfer-Puffer für 5 min auf der Wippe äquilibriert und anschließend der Blot in folgender Reihenfolge, angefangen auf der Anoden-Platte, aufgebaut: 2 Lagen in Towbin-Puffer angefeuchtetes Whatmanpapier, Gel, PVDF-Membran, 2 Lagen in Towbin-Puffer angefeuchtetes Whatmanpapier. Dann wird die Kathoden-Platte aufgelegt, die Blotkammer geschlossen und der Transfer unter Anlegen einer Spannung von 20 V für 60 min durchgeführt. Danach wird der Blot abgebaut, das Gel zur Überprüfung des Proteintransfers einer Coomassie-Färbung

unterzogen und die Membran zur Vorbereitung auf den Immunoblot in 5 % Milchpulver in NCP mit Azid für 2 h bei RT auf der Wippe inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Bei einem Immunoblot werden Proteine durch die Bindung eines ersten und zweiten Antikörpers auf einer Westernblotmembran nachgewiesen. Dabei ist der erste Antikörper spezifisch für das zu untersuchende Protein, während der zweite speziesspezifisch an den Immunglobulinrest des ersten bindet und dem Nachweis von diesem dient. Dazu wird die Membran im Anschluss an die Blockierung für 3 h bei RT oder ÜN bei 4°C im Kühlraum auf der Wippe mit dem 1. Antikörper, verdünnt in NCP mit 5 % Milchpulver und Azid, inkubiert. Es folgen drei Waschschrte in NCP ohne Azid auf der Wippe, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Danach wird die Membran mit dem 2. Antikörper, verdünnt in NCP mit 5 % Milchpulver ohne Azid, für 2 h bei RT auf der Wippe inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet speziesspezifisch an die F<sub>c</sub>-Rezeptorregion des ersten und trägt ein HRP (engl. *Horse Radish Peroxidase*)-Konjugat. Dann wird die Membran wieder dreimal in NCP ohne Azid gewaschen. Nach der Blockierung erfolgen alle Inkubationen in NCP ohne Azid, da dieses die HRP inaktiviert.

Der Nachweis der gebundenen Antikörper auf der Membran erfolgt mittels Chemilumineszenz mit Hilfe eines speziellen ECL-Reagenzes. Das Nachweisprinzip beruht auf der Umsetzung des Substrats Wasserstoff durch die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase, wobei Sauerstoff frei wird. Der Sauerstoff führt zur Anregung des im ECL-Reagenz enthaltenen Luminols, welches in seinem angeregten Zustand eine Chemilumineszenz aussendet, die mit Hilfe des *LAS-Imager* dokumentiert werden kann. Alternativ kann die Chemilumineszenz auch durch das Auflegen eines Röntgenfilms und die anschließende Entwicklung in einer Entwicklermaschine erfolgen.

### 3.2.1.7. ELISA

Ein ELISA (engl. *Enzyme Linked Immunsorbant Assay*) ist ein antikörperbasiertes Verfahren zum Nachweis der Proteinkonzentration in einer Lösung (VOLLER et al., 1978).

Dazu wird zunächst der erste Antikörper, welcher spezifisch für das zu nachzuweisende Protein ist, an eine Trägersubstanz gekoppelt. Dann wird die zu analysierende Lösung hinzugefügt, wobei das zu untersuchende Protein an den ersten Antikörper binden kann. Nun wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der ebenfalls spezifisch für das Protein ist, es allerdings an einem anderen Epitop erkennt, sodass sich erster und zweiter Antikörper nicht gegenseitig beeinträchtigen können. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym konjugiert,

das einen Nachweis erlaubt. Dies kann beispielsweise die HRP sein, sodass der Nachweis über Chemilumineszenz erfolgt (vgl. Abschnitt 3.2.1.6). Durch Zugabe des entsprechenden Substrats wird die Nachweisreaktion ausgelöst und mit einem geeigneten Gerät ausgelesen. Dabei ist die Stärke der Reaktion direkt proportional zur Menge an nachzuweisendem Protein. Diese Methode erlaubt die quantitative Bestimmung sehr geringer Antigenmengen. Da bei diesem Nachweis ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht, spricht man auch von „Sandwich-ELISA“.

Die Durchführung des ELISAs erfolgte durch die AG Diehl.

### **3.2.1.8. Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Bakterien**

#### **3.2.1.8.1. Überexpression von Proteinen**

Für die Überexpression eines rekombinanten Proteins werden zunächst 50 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien angeimpft und ÜN in einem Schüttelinkubator bei 250 rpm und 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Vorkultur mit einer Verdünnung von 1:100 in die Hauptkultur überimpft und diese dann im Inkubator bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 kultiviert. Bei dieser optischen Dichte befinden sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase. In dieser Phase kann die Überexpression des Proteins, welches unter einem induzierbaren Promotor exprimiert wird, durch die Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 0,5 mM gestartet werden. Die induzierte Hauptkultur wird dann wiederum ÜN bei 250 rpm und 22°C inkubiert. Nun werden die Bakterien durch Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm (Standzentrifuge, Rotor: JA-10; JA-14) und 4°C pelletiert. Alle folgenden Schritte erfolgen auf Eis. Das erhaltene Pellet wird in einem geeigneten Volumen Lysis-Puffer (z.B. Aufnahme des Pellets einer 4 l-Kultur in 50 ml Puffer) resuspendiert. Für die Lyse der Bakterienzellen wird die erhaltene Suspension einer Behandlung mit dem Ultraschallstab unterzogen. Dies erfolgt durch viermalige Sonifizierung bei einer Tip-Energie von 8 für 1 min mit einer Unterbrechung von jeweils 30 s. Für einen weiteren Aufschluss der Zellen wird die Suspension in einen *Douncer* überführt und 20-30 Züge *gedounced*. Das erhaltene Rohlysat wird nun für 30 min bei 35.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Stand-Ultrazentrifuge; Rotor: TI-45), um ungewünschte Zelltrümmer vom Überstand, welcher das überexprimierte Protein löslich enthält, zu trennen. Aus dem erhaltenen, sogenannten *Cleared*-Lysat kann dann die Aufreinigung des Proteins erfolgen.

### 3.2.1.8.2. Aufreinigung von Proteinen mittels GST-Tag

Bei der Proteinaufreinigung bedient man sich sogenannter Affinitäts-*Tags*, die an das Zielprotein fusioniert exprimiert werden, sodass eine Aufreinigung des Fusionsproteins mittels Affinitäts-Chromatographie möglich ist. Zwei Beispiele für diese *Tags* sind der GST-*Tag*, die 26 kDa große Glutathion-S-Transferase, dessen Bindungspartner Glutathion darstellt, und der mit 1 kDa deutlich kleinere Strep-*Tag*, dessen Bindungspartner das Streptavidin ist.

Für die eigentliche Aufreinigung werden spezielle Säulen mit Agarose-*Beads* befüllt. An diese *Beads* ist jeweils der entsprechende Bindungspartner gekoppelt, sodass das Fusionsprotein daran binden kann.

Für die Aufreinigung von Proteinen mittels GST-*Tag* wird die Säule mit Glutathion-*Beads* befüllt und mit 5 Vol. (in Bezug auf das *Bead*-Volumen) Lysis-Puffer äquilibriert. Der Durchfluss des Puffers erfolgt dabei immer allein durch die Gravitationskraft. Dann kann die Säule mit dem, wie in Abschnitt 3.2.1.8.1 beschrieben, gewonnen *Cleared*-Lysat beladen werden. Zum Waschen wird die Säule zunächst mit 10 Vol. GST-Waschpuffer und weiterhin mit 5 Vol. PBS befüllt. Das gewaschene und an die *Beads* gekoppelte Fusionsprotein wird mit diesen in ein frisches Reaktionsröhrchen überführt und mit 1 Vol. PBS und mit einer finalen Konzentration von 100 U/ml Thrombin versehen. Thrombin ist eine Protease, die an einer bestimmten Erkennungssequenz ein Protein schneiden kann. Diese Eigenschaft von Proteasen macht man sich für die Abspaltung der Affinitäts-*Tags* zu Nutze, in dem man zwischen das Protein von Interesse und den *Tag* eine solche Sequenz einfügt, um den eventuell störenden *Tag* abschneiden zu können. Das an die *Beads* gekoppelte Fusionsprotein versehen mit Thrombin wird ÜN auf dem Endlosrad bei 4°C im Kühlraum inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird die *Bead*-Suspension zurück in die Säule gegeben und der Durchfluss, welcher nun das gewünschte Protein ohne *Tag* enthält, aufgefangen. Die Säule kann regeneriert werden indem man sie mit GST-Elutionspuffer behandelt und anschließend mit GST-Waschpuffer wäscht. Durch Übersichtung der Säule mit GST-Lagerungslösung kann diese für eine weitere Anwendung einige Wochen im Kühlraum belassen werden.

Das aufgereinigte Protein kann bis zu seiner Verwendung dialysierend gegen PBS mit 0,1 mM DTT und 0,1 % Azid bei 4°C im Kühlraum gelagert werden. Das DTT sorgt als Reduktionsmittel für eine Konservierung des Proteins, da es die Oxidation von SH-Gruppen zu Disulfidbrücken

verhindert. Das Azid verhindert ein Wachstum von Bakterien. Für eine längerfristige Lagerung wird das aufgereinigte Protein in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C deponiert.

#### **3.2.1.8.3. Aufreinigung des Proteins mittels Strep-Tag**

Die Aufreinigung von Strep-Tag-Fusionsproteinen erfolgt zum Großteil analog zu der Aufreinigung von Proteinen mit GST-Tag. Als *Beads* werden Streptactin-Beads verwendet. Streptactin ist eine rekombinante Variante des Streptavidins, welches den Strep-Tag deutlich besser bindet.

Nachdem das Lysat auf die Säule gegeben wurde, wird diese mit 15 Vol. Strep-Tag-Waschpuffer pH 8,0 gewaschen. Da der Strep-Tag mit einem Molekulargewicht von 1 kDa vergleichsweise klein ist, kann er am Fusionsprotein belassen werden. Deshalb kann bei dieser Aufreinigung das Fusionsprotein durch Zugabe von 0,5 Vol. Strep-Tag-Elutionspuffer direkt von der Säule eluiert werden. Dieser Puffer enthält Desthiobiotin, welches als Biotinderivat mit dem Strep-Tag um die Bindung an das Streptactin konkurriert und es verdrängt. Durch Zugabe von 15 Vol. Strep-Tag-Regenerationspuffer wird die Säule regeneriert und muss anschließend mit 4 Vol. Strep-Tag-Waschpuffer pH 10,5 und 8 Vol. Waschpuffer pH 8,0 gewaschen werden. Diese Säule wird zur Lagerung mit Strep-Tag-Waschpuffer pH 8,0 überschichtet.

Für die Lagerung von Strep-Tag-Fusionsproteinen gelten dieselben Maßnahmen, die bereits in Abschnitt 3.2.1.8.2 beschrieben wurden.

#### **3.2.1.9. Aufkonzentrierung von Proteinen**

Zur Aufkonzentrierung von Proteinen verwendet man sogenannte Centricon-Röhrchen. Dies sind spezielle Filtrationseinheiten mit einer Membran in der Mitte, welche Molekulargewicht-abhängig für Proteine durchlässig ist. Man gibt die zu konzentrierende Proteinlösung auf den Filter und zentrifugiert bis ein gewünschtes Restvolumen auf dem Filter zurückgeblieben ist. Dann wird die Einheit des Röhrchens, die die überflüssige Lösung enthält, entfernt, das Centricon-Röhrchen umgedreht und erneut zentrifugiert, sodass sich zum Schluss das Protein in dem gewünschten Restvolumen befindet.

Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

### 3.2.2. Aufreinigung von Aktin und biochemische Assays mit Aktin

#### 3.2.2.1. Gewinnung von G-Aktin aus Aktin-Aceton-Puder

Die G-Aktin-Gewinnung erfolgt aus Aktin-Aceton-Puder, welches aus Skelettmuskel von Kaninchen hergestellt und von der Arbeitsgruppe Faix (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt wurde. Die Aufreinigung aus Aktin-Aceton-Puder ist eine Folge von Depolymerisation und Polymerisation des Aktins (SPUDICH, WATT, 1971).

Zu Beginn werden 5 g Aktin-Aceton-Puder in ein Becherglas gegeben, mit 100 ml G-Puffer versehen und 30 min auf dem Rührer bei 4°C im Kühlraum rühren gelassen (Depolymerisation). Anschließend wird bei 4°C im Kühlraum das Aktin-Aceton-Puder-G-Puffer-Gemisch auf sogenanntes *Cheese-Cloth* (Verbandsgaze) gegeben und über einem Becherglas ausgequetscht. Das ausgequetschte Gemisch wird zurück in das alte Becherglas gegeben, erneut mit 100 ml G-Puffer versehen und 30 min auf dem Rührer bei 4°C im Kühlraum rühren gelassen. Dieser Schritt wird zwölfmal wiederholt und von jeder Fraktion eine Probe genommen, die in der SDS-PAGE überprüft wird. Nachdem die Fraktionen im Gel auf Effizienz und Reinheit geprüft wurden, wird entschieden, welche Fraktionen weiterverwendet und dementsprechend vereinigt werden. Nun folgt eine Zentrifugation für 30 min bei 8000 rpm (Standzentrifuge, Rotor: JA-14) und 4°C, um grobe störende Rückstände zu entfernen. Der Überstand wird mit 50x Polymerisationspuffer versehen (Polymerisation). Das erhaltene Gemisch wird für mindestens 2 h auf dem Rührer bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt kann auch ÜN ausgedehnt werden. Anschließend wird dem Gemisch unter Rühren KCl mit einer Endkonzentration von 0,8 M hinzugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Dieser Schritt dient der Entfernung von Tropomyosin. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 3 h bei 38.000 rpm und 4°C (Stand-Ultrazentrifuge; Rotor: TI-45). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in einen *Douncer* überführt, mit einem entsprechenden Volumen G-Puffer versehen und *gedounced* bis sich eine homogene, viskose Flüssigkeit ergibt (Depolymerisation). Diese wird in einen Dialyseschlauch transferiert und gegen G-Puffer dialysiert. Die Dialyse erfolgt unter Rühren bei 4°C im Kühlraum. Nach 8 h ist das Dialysegleichgewicht erreicht und der G-Puffer muss ausgetauscht werden. Die Dialyse kann bis zu 96 h unter fortwährendem Pufferwechsel ausgedehnt werden. Anschließend wird das dialysierte Aktin für 2 h bei 53.700 rpm und 4°C zentrifugiert (Tisch-Ultrazentrifuge;

Rotor: MLA-80). Dann werden 2/3 des Überstands in eine Dialysesäule überführt und zur Lagerung gegen G-Puffer bei 4°C im Kühlraum dialysiert. Die übrigen 1/3 werden verworfen. Um kurze Oligomere und auch *Capping*-Proteine aus dem gewonnenen Aktin zu entfernen, unterzieht man es der Gelfiltration in der Äkta-FPLC. Dabei können kurze und Filamente an deren Ende *Capping*-Proteine sitzen, die Gelmatrix schneller passieren als G-Aktinmonomere, die von den Poren des Gels zurückgehalten werden. Die gesammelten Fraktionen werden mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft, anschließend vereinigt und dialysierend gelagert.

Das so aufgereinigte G-Aktin kann im Dialyseschlauch bei wöchentlichem G-Puffer-Wechsel über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

### **3.2.2.2. Aktin-Assays**

#### **3.2.2.2.1. Aktin-Pelleting-Assay**

Der *Aktin-Pelleting*-Assay, auch Aktin-Ko-Sedimentations- oder Aktin-Bindungsassay genannt, ist eine Methode, um zu prüfen, ob das aufgereinigte, zu untersuchende Protein an Aktin bindet. Durch Ultrazentrifugation kann G- von F-Aktin getrennt werden, wobei sich anschließend das G-Aktin im Überstand und das F-Aktin im Pellet befindet. Das zu untersuchende Protein ist anschließend je nach seiner Fähigkeit Aktin zu binden in einer der beiden Fraktionen nachweisbar (BROWN et al., 1982).

Für den Assay werden äquimolare Mengen G-Aktin und zu untersuchendes Protein in einem Ansatz von insgesamt 100 µl mit Assay-Polymerisationspuffer und Wasser gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 1 h bei 70.000 rpm und 4°C (Tisch-Ultrazentrifuge; Rotor: TLA-100). Nach der Zentrifugation werden Überstand als auch Pellet mit SDS-Probenpuffer versehen, in einer SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung analysiert.

#### **3.2.2.2.2. Pyren-Aktin-Assay**

Der Pyren-Aktin-Assay ist ein kinetischer Assay, mit welchem die Aktivität Aktin bindender Proteine gegenüber Aktin analysiert werden kann. Diese Methode basiert auf der Gegebenheit, dass die Fluoreszenz von Pyren markiertem G-Aktin beim Einbau in Aktinfilamente bis zu einem Faktor von 20 zunimmt (COOPER et al., 1983). So kann mit dieser

Methode die Kinetik von Polymerisation und Depolymerisation von Aktin im Hinblick auf die Aktivität bestimmter Proteine untersucht werden.

### 3.2.2.2.2.1. Markierung von Aktin mit Pyren

Die Markierung des Aktins mit dem Fluorophor Pyren erfolgt am Cystein 374. Dies ist der reaktivste Cystein-Rest im Molekül. Für die Markierung wird frisch aufgereinigtes Aktin ÜN gegen P-Puffer bei 4°C im Kühlraum dialysiert. Um die Polymerisation zu starten wird am darauffolgenden Tag Polymerisationspuffer dazugegeben. Nach 1 min Inkubationszeit werden schnell 165 mM Pyren-Maleimid in DMSO hinzugefügt. Alle folgenden Schritte werden unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Lösung wird zunächst für 5 min bei RT und anschließend für weitere 40 min auf Eis und letztendlich ÜN bei 4°C im Kühlraum rühren gelassen. Dann wird das Aktingemisch in einen Dialyseschlauch überführt und für 48 h gegen G-Puffer bei 4°C im Kühlraum dialysiert. Darauf folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm und 4°C (Tisch-Ultrazentrifuge; Rotor: MLA-80). Das G-Aktin im Überstand wird mit Polymerisationspuffer versetzt und für 30 min bei RT inkubiert, um die Polymerisation zu starten. Anschließend erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für 2 h bei 60.000 rpm und 4°C (Tisch-Ultrazentrifuge; Rotor: MLA-80). Das F-Aktin-Pellet wird in einen *Douncer* überführt, mit G-Puffer versetzt und *gedounced* wird. Dann wird das markierte Aktin für 48 h im Kühlraum dialysiert. Es folgt ein letzter Zentrifugationsschritt für 20 min bei 60.000 rpm und 4°C (Tisch-Ultrazentrifuge; Rotor: MLA-80). Nun wird mit Hilfe des Photometers bei einer Wellenlänge von 290 nm und 390 nm die Effizienz der Pyrenmarkierung überprüft. Letztendlich wird das Pyren markierte Aktin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

### 3.2.2.2.2.2. Polymerisations-Assay

Für den Polymerisations-Assay wird G-Aktin (20 % Pyren-Aktin + 80 % nicht markiertes Aktin) mit dem aufgereinigten, zu untersuchenden Protein in einen Ansatz von insgesamt 50 µl mit G-Puffer in eine 96-well-Platte pipettiert und diese in das Thermo Varioskan Flash Fluorimeter gestellt. Über die Dispenser-Funktion des Geräts wird 50 µl Assay-Polymerisationspuffer eingespritzt, um die Reaktion zu starten. Anschließend wird die Messung im Varioskan Fluorometer durchgeführt. Dabei werden folgende Einstellungen vorgenommen: Anregungswellenlänge: 342 nm; Emissionswellenlänge: 388 nm; Messintervall: 20 s; Messzeit: 30 min.



#### 3.2.2.2.3. Depolymerisations-Assay

Beim Depolymerisations-Assay wird das G-Aktin (20 % Pyren-Aktin + 80 % nicht markiertes Aktin) zunächst in einem Ansatz mit Assay-Polymerisationspuffer für 2,5 h bei RT vorinkubiert. Das aufgereinigte, zu untersuchende Protein und Latrunculin B werden in eine 96-well-Platte vorgelegt. Das Latrunculin B ist ein Toxin des Schwamms der Gattung *Latrunculia*. Es fängt frei werdendes G-Aktin ab, bindet es irreversibel und sorgt für eine Verlagerung der Gleichgewichtsreaktion in Richtung Depolymerisation. Nach der Vorpolymerisation wird das erhaltene F-Aktin ebenfalls in die Platte pipettiert (Endvolumen: 100 µl) und die Messung im Varioskan Fluorometer durchgeführt. Dabei werden die gleichen Einstellungen vorgenommen, wie beim Polymerisations-Assay.

#### 3.2.2.3. *Falling-Ball-Assay*

Der *Falling-Ball-Assay*, auch Viskositäts-Assay genannt, ist eine Methode zur Untersuchung der Aktivität Aktin bindender Proteine im Hinblick darauf, die Polymerisation von Aktin zu beeinflussen. Durch die Aktin-Polymerisation ändert sich die Viskosität der Lösung, was in einem Kugelfallviskosimeter bestimmt werden kann. Ändert sich die Viskosität einer Lösung, ändert sich auch gleichzeitig die Zeit, die eine Kugel benötigt, um in dieser eine definierte Strecke zurückzulegen. (MACLEAN-FLETCHER, POLLARD, 1980)

Für diesen Assay wird in einem Ansatz mit einem Endvolumen von 120 µl das aufgereinigte, zu untersuchende Protein mit Assay-Polymerisationspuffer und Wasser gegeben und dies, vor der Überführung in eine Glaskapillare mit G-Aktin gemischt. Die Kapillare wird an einem Ende mit Knetmasse verschlossen und senkrecht in eine Halterung gestellt. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wird die befüllte Glaskapillare so in eine Apparatur gestellt, dass sie eine Neigung von ca. 15° aufweist. Nun wird eine Metallkugel in die Kapillare gegeben und die Zeit gemessen, die die Kugel benötigt, um eine zuvor festgelegte Strecke zurückzulegen.

### 3.3. Zellbiologische Methoden

#### 3.3.1. Isolierung von Zellen aus lymphatischen Organen der Maus

Für die Isolation von Zellen aus Organen wird die adulte Maus zunächst durch Inhalation von CO<sub>2</sub> getötet. Anschließend werden die lymphatischen Organe, wie Thymus, Lymphknoten

(zervikal, axillär, inguinal) und Milz präpariert und direkt in kaltes RPMI-Medium auf Eis überführt. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension werden die Organe zwischen den matten Schliffenden von Objektträgern zerkleinert und durch Auf- und Abpipettieren die Zellen noch weiter vereinzelt. Zuletzt wird die Zellsuspension durch einen Filcon-Filter filtriert, um störende Gewebereste zu eliminieren.

### 3.3.2. Isolierung von Immunzellen aus murinem Blut

Die Abnahme von Blut erfolgt direkt nach dem Töten der Maus aus der Aorta im Bauchraum. Dazu wird zuvor in eine Spritze ein kleines Volumen MACS-Puffer aufgezogen. Das EDTA im Puffer verhindert die Blutgerinnung, indem es die dafür essentiellen Calciumionen komplexiert. Nach Einstechen der Kanüle in das Gefäß können ca. 1 ml Blut aufgezogen werden. Zur Überführung des Bluts aus der Spritze in ein Reaktionsgefäß wird die Kanüle entfernt.

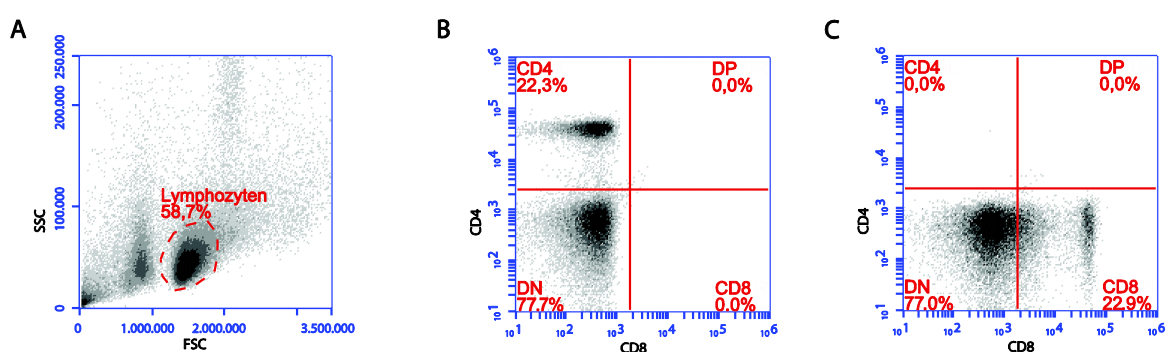
#### 3.3.2.1. Lyse von Erythrozyten

Um die für die weitere Analyse von Immunzellen störenden Erythrozyten zu eliminieren, muss sowohl das Blut als auch die Milz-Einzelzellsuspension einer Blutzelllyse unterzogen werden. Dazu werden die für 10 min bei 1000 rpm und 4°C im *Swingout*-Rotor (Tischzentrifuge) pelletierten Zellen mit 3 ml RBC (engl. Red Blood Cell)-Lyse-Puffer versehen und für 4 min bei RT unter Schwenken inkubiert. Der RBC-Puffer enthält aufgrund der Salze Ammoniumchlorid und Kaliumhydrogencarbonat auch Ammonium- und Hydrogencarbonationen, die im Gleichgewicht mit Ammoniak und Kohlendioxid stehen. Letztere Verbindungen können die Zellmembran passieren. In der Zelle wird der Ammoniak wieder spontan in Ammoniumionen umgewandelt und die in Erythrozyten in großen Mengen vorhandene Carbonanhydrase beschleunigt die Rückreaktion von Kohlendioxid zu Hydrogencarbonationen. Dies sorgt somit zur verstärkten Aufnahme von Ammoniak und Kohlendioxid in die Zelle, was die Erythrozyten schädigt. Um eine Schädigung der Leukozyten zu vermeiden, ist es wichtig, die Inkubationszeit einzuhalten und anschließend die Reaktion durch Verdünnung mit MACS-Puffer zu stoppen. Dann wird die Zellsuspension unter den oben beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Nun müssen die Zellen durch Resuspendieren in MACS-Puffer und erneute Zentrifugation gewaschen werden, um die Salze aus dem RBC-Puffer zu entfernen. Bei Bedarf kann die Blutzelllyse wiederholt werden

### 3.3.3. Durchflusszytometrische Untersuchung von Zellen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Untersuchung der Größe, der Granularität und die Immunfluoreszenzanalyse von Zellen. Im Durchflusszytometer werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom aufgenommen, vereinzelt und passieren dann einen Laserstrahl. Gelangt eine Zelle in den Strahlengang, wird der Strahl je nach Eigenschaften der Zelle unterschiedlich stark gestreut. Dabei unterscheidet man zwischen dem Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *Forward Scatter*) und dem Seitenstreulicht (SSC, engl. *Side Scatter*), das als Maß für die Größe bzw. die Granularität der Zellen dient. Weiterhin können sowohl Oberflächenmoleküle als auch intrazelluläre Proteine der Zellen mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern markiert werden. Die Fluorochrome werden durch den Laserstrahl angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert. Diese Methode ermöglicht die Analyse großer Zellzahlen in vergleichsweise kurzer Zeit.

Für eine Messung werden immer 10.000-30.000 Zellen im Thymozyten- bzw. Lymphozyten-*Gate* aufgenommen. Dieses *Gate* wird in der FSC/SSC-Darstellung festgelegt. Links der Lymphozyten findet man eine weitere Population, die tote Zellen darstellen und in der ganz linken Ecke sind andere, nicht zelluläre Partikel lokalisiert. Mit Hilfe von Einzelfärbungen werden die verwendeten FACS-Antikörper überprüft. In Abbildung 3.1 ist exemplarisch die Lage eines Lymphozyten-Gates und Einzelfärbungen für CD4- und CD8-positive Zellen dargestellt.



**Abbildung 3.1: Exemplarisches Lymphozyten-Gate und Einzelfärbungen für CD4- und CD8-positive Zellen.** In (A) ist die Lage eines Lymphozyten-Gates bei der Analyse von Einzelzellen aus Milz dargestellt. (B) zeigt eine Einzelfärbung für CD4-positive Zellen mit dem FACS-Antikörper CD4- PerCP-e710 und (C) eine Einzelfärbung für CD8-positive Zellen mit dem FACS-Antikörper CD8-FITC ebenfalls an Milz-Einzelzellen.

### 3.3.3.1. Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Zellen werden die, wie in Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, gewonnenen Zellen einer Antikörperfärbung unterzogen. Dazu inkubiert man die Zellen in einem Volumen von 100 µl mit dem entsprechenden Antikörper, verdünnt in MACS-Puffer, für 30 min bei Dunkelheit und 4°C auf Eis. Anschließend wird die Inkubation durch Zugabe von 500 µl MACS-Puffer abgestoppt. Durch eine Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm und 4°C im *Swingout*-Rotor (Tischzentrifuge) werden die Zellen pelletiert und anschließend in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wird ein weiteres Mal wiederholt bevor die Zellen letztendlich in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer vermessen werden.

### 3.3.3.2. Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Für die Färbung intrazellulärer Proteine müssen die Zellen zunächst fixiert und anschließend permeabilisiert werden. Hierfür werden die Zellen mit 400 µl kaltem Histofix versehen und für 15 min bei 4°C auf Eis inkubiert. Zum Abstoppen werden dem Ansatz 700 µl MACS-Puffer mit 0,5 % Tween-20 hinzugefügt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm und 4°C im *Swingout*-Rotor (Tischzentrifuge). Nun werden die Zellen mit 300 µl MACS-Puffer gewaschen. An dieser Stelle können die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und ÜN bei 4°C auf Eis gelagert werden. Im nächsten Schritt werden die Zellen für 10 min in 300 µl MACS-Puffer mit 0,1 % Triton-X-100 bei 4°C auf Eis inkubiert. Zum Pelletieren der Zellen werden diese zentrifugiert (s.o.) und dann in 300 µl MACS-Puffer mit 0,5 % Tween-20 resuspendiert. Es erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bevor die Zellen zur Blockierung in 300 µl MACS-Puffer mit 1 % Fischgelatine aufgenommen werden. Dann schließt sich eine Inkubation für 45 min bei 4°C auf Eis im Kühlraum an. Jetzt kann die eigentliche intrazelluläre Färbung stattfinden, die nach der Blockierung der Zellen wie eine extrazelluläre Färbung abläuft (vgl. Abschnitt 3.3.3.1). Einer intrazellulären Färbung kann bereits eine extrazelluläre Färbung vorausgegangen sein. In diesem Fall schließt sich an die extrazelluläre Färbung direkt die Fixierung an.

### 3.3.3.3. Verwendung von *Counting-Beads* zur Zellzahlbestimmung im Durchflusszytometer

Soll parallel zum Einmessen einer bestimmten Anzahl von Zellen gleichzeitig die Zellzahl in der Probe bestimmt werden, verwendet man sogenannte *Counting-Beads*. Bei der

Untersuchung mit dem Durchflusszytometer zeigen sie eine klar abzugrenzende Population im *Forward Scatter*. Durch Zugabe eines bestimmten Volumens dieser *Bead*-Suspension, die dann eine definierte Anzahl *Counting-Beads* beinhaltet, kann die Zellzahl in der Probe genau bestimmt werden. Diese Methode verwendet man insbesondere bei der Untersuchung der Proliferation der Zellen über einen bestimmten Zeitraum.

### **3.3.4. Apoptose-Assay**

Bei der Apoptose unterlaufen die Zellen den programmierten Zelltod. Dieser Prozess ist unter anderem durch den Verlust der Asymmetrie der Zellmembran gekennzeichnet. Dies führt dazu, dass das Membranphospholipid Phosphatidylserin von der Innenseite der Membran auf die Außenseite transloziert wird. Das Phospholipid-Bindeprotein AnnexinV hat eine hohe Affinität für Phosphatidylserin, sodass es an Zellen bindet, die dieses Lipid auf der Oberfläche tragen. Aus diesem Grund kann fluoreszenzmarkiertes AnnexinV als Marker für apoptotische Zellen in der Durchflusszytometrie verwendet werden. (VERMES et al., 1995) Zum Ausschluss von toten und spät apoptotischen Zellen ist eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid essentiell, ein Farbstoff, der in die DNA interkaliert und somit nur bei einer beschädigten Zellmembran die Zelle anfärbt.

Für den Apoptose-Assay wird das *FITC AnnexinV Apoptosis Detection Kit I* nach Herstellerangaben verwendet. Dem Apoptose-Assay ging immer eine extrazelluläre Färbung voraus.

### **3.3.5. Zellseparation**

#### **3.3.5.1. Zellseparation mit Hilfe magnetischer Antikörper (MACS)**

Diese Methode, auch als MACS (engl. *Magnetic Activated Cell Sorting*) bezeichnet, dient der Separation bestimmter Zellpopulationen aus Gemischen von Zellen. Dazu verwendet man Antikörper gegen extrazelluläre Epitope, welche an supramagnetische *Beads* gekoppelt sind. So markierte Zellen können über spezielle MACS-Säulen, die in einem stark magnetischen Halter platziert sind, gebunden werden.

Für die Zellseparation mit Hilfe magnetischer Antikörper werden diverse Kits der Firma Miltenyi nach Herstellerangaben verwendet. Man unterscheidet zwischen der positiven Selektion, wobei die markierten und durch Magnetismus an der Säule zurückgehaltenen

Zellen die gewünschte Zellpopulation darstellen und der Depletion, wohingegen mit den unmarkierten Zellen, die sich im Durchfluss befinden, weitergearbeitet wird.

### 3.3.5.2. Zell-Sorting (FACS)

Die Zellseparation mit Hilfe der MACS-Technologie liefert eine Reinheit der isolierten Zellpopulationen von 85-99 %. Zur Erreichung eines höheren Reinheitsgrads und einer größeren Zellausbeute verwendet man einen Zell-Sorter, auch FACS (engl. *Fluorescence Activated Cell Sorter*) genannt, dessen Funktionsweise der eines Durchflusszytometers mit einer zusätzlichen Einheit zur Zellsortierung entspricht. In diesem Gerät werden die Zellen, nachdem sie den Laserstrahl passiert haben, in einzelne Tropfen verpackt, die elektrisch geladen und mit Hilfe eines elektrischen Felds ihrer Ladung entsprechend in ein Gefäß abgelenkt werden.

Das Zell-Sorting erfolgte in der *Flow Cytometry Core Facility* am Uniklinikum Bonn.

### 3.3.6. Kultivierung primärer T-Zellen der Maus

Zur Kultivierung von primären T-Zellen muss eine möglichst sterile Präparation dieser gewährleistet sein. Dazu wird das Fell der Maus in Ethanol getränkt und für die Präparation der Organe mit Ethanol desinfiziertes Präparationsbesteck verwendet. Alle weiteren Schritte der Präparation (vgl. Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2) erfolgen unter der Sterilbank in der Zellkultur.

Für die Kultivierung der Zellen ist die Kenntnis über die Zelldichte wichtig, da eine bestimmte Anzahl von Zellen in ein definiertes Volumen Medium aufgenommen werden (z.B. 12-*well*-Platte:  $4 \times 10^6$  Zellen in 1,25 ml RPMI-Medium pro *well*). Zur Bestimmung der Zelldichte wird die Neubauerzählkammer verwendet. Nach dem Ausbringen der Zellen werden diese bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Zur Kultivierung von T-Zellen werden dem Medium  $\beta$ -Mercaptoethanol und Interleukin-7 hinzugefügt.  $\beta$ -Mercaptoethanol fängt als reduzierendes Reagenz toxische Sauerstoffradikale ab, während Interleukin-7 als Wachstumsfaktor T-Zellen stimuliert und somit ihr Überleben sichert. Das  $\beta$ -Mercaptoethanol befindet sich von vorne herein im Medium. Das Interleukin-7 wird erst nach 1 h Inkubation bei 37°C im Inkubator hinzugefügt.

### 3.3.7. Aktivierung von T-Zellen

Für die Aktivierung von T-Zellen werden die beiden Rezeptoren CD3, eine Komponente des T-Zellrezeptorkomplexes und CD28, ein Co-Rezeptor dieses, stimuliert. Während anti-CD28 (Endkonzentration: 1 µg/ml) löslich dem Medium hinzugefügt wird, wird die Zellkulturplatte mit anti-CD3 beschichtet. Dazu wird CD3 (Endkonzentration: 5 µg/ml) in PBS verdünnt und 100 µl dieser Verdünnung in ein *well* einer 96-*well*-Platte gegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 1 h bei 37°C im Brutschrank wird die Platte dreimal mit PBS gewaschen bevor die Zellen ausgebracht werden.

### 3.4. Haltungs- und Zuchtbedingungen von Mäusen

Die Haltung und Zucht der Mäuse erfolgt in einem sogenannten IVC (engl. *Individually Ventilated Cages*)-System bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden, einer Temperatur von 21°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 %. Dabei stehen den Tieren Wasser und Trockenfutter zur Verfügung.

### 3.5. Methoden zur Selektion eines Aptamers

#### 3.5.1. SELEX

Die systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (engl. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*, SELEX) ist ein sich wiederholender Prozess bestehend aus drei Schritten:

- Inkubation der Nukleinsäurebibliothek mit dem Zielmolekül (Selektion)
- Separation der bindenden Nukleinsäuresequenzen von der Fraktion, die nicht bindet (Elution)
- Amplifikation der bindenden Nukleinsäuresequenzen (Amplifikation)

Nun kann der Zyklus erneut beginnen und mehrfach wiederholt werden, um eine Anreicherung bindender Sequenzen zu gewährleisten.

#### 3.5.1.1. Kopplung des Zielmoleküls an magnetische *Beads*

Für die Selektion muss das Zielprotein, ein Strep-*Tag*-Fusionprotein, zunächst an eine Matrix immobilisiert werden. Dazu wird das Fusionsprotein an magnetische Streptactin-*Beads* gekoppelt.

Für die Kopplung werden 5 mg *Beads* in ein Reaktionsgefäß überführt und diese dreimal mit jeweils 500 µl PBS gewaschen. Dabei wird das Reaktionsgefäß in einen Magnethalter mit seitlichem Magneten gestellt, sodass sich die *Beads* am Magneten sammeln und der Überstand abgenommen werden kann. Nach dem Waschen werden die *Beads* in 500 µl PBS aufgenommen und 200 µg Strep-Tag-Fusionsprotein hinzugefügt. Dieses Gemisch wird dann für 1 h auf dem Endlosrad bei 4°C im Kühlraum inkubiert. Anschließend werden die nun mit Strep-Tag-Fusionsprotein gekoppelten *Beads* dreimal mit 500 µl PBS mit 1 mg/ml BSA gewaschen und zuletzt in 1500 µl PBS mit 1 mg/ml BSA aufgenommen. Diese können bei 4°C gelagert werden.

Der Erfolg der Kopplung wird mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 3.2.1.4) überprüft, wobei die gekoppelten *Beads* in ein geeignetes Volumen SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 10 min bei 95°C aufgekocht und der Überstand direkt auf das Gel aufgetragen wird.

### 3.5.1.2. Selektion

Bei der Selektion wird die Nukleinsäurebibliothek mit dem an die *Beads* gekoppelten Fusionsprotein inkubiert. Die Nukleinsäurebibliothek wird über Festphasensynthese extern hergestellt. Ein solches Oligonukleotid der Bibliothek ist so designt, dass es eine zentrale randomisierte Region enthält, die durch konstante Primer-Regionen flankiert wird.

Der eigentlichen Selektion wird eine sogenannte Negativselektion vorgeschaltet. Dabei wird die Nukleinsäurebibliothek zunächst mit nicht gekoppelten *Beads* inkubiert, um solche Sequenzen auszuschließen, die eine Affinität für die *Beads* selbst haben.

Der SELEX-Ansatz besteht aus 80 µl der ungekoppelten *Beads* (5 mg *Beads* in 1500 µl PBS mit 1 mg/ml BSA), 100 µM der Nukleinsäurebibliothek, 3 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub> und 7 µl H<sub>2</sub>O. Dieser wird für 30 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Währenddessen werden die *Beads* immer wieder mit der Pipette resuspendiert. Nach der Inkubation wird der Ansatz in den Magnethalter gestellt und der Überstand zu 80 µl einer Suspension der gekoppelten *Beads* (siehe Abschnitt 3.5.1.1) überführt, von denen zuvor der Überstand ebenfalls mit Hilfe des Magnethalters entfernt wurde. Nun erfolgt die eigentliche SELEX-Inkubation unter den gleichen Bedingungen, wie bereits beschrieben.

### 3.5.1.3. Separation

Zur Separation der gebundenen von den nicht gebundenen Nukleinsäuresequenzen wird nach der Inkubation zunächst der Überstand, der die ungebundene Fraktion darstellt,



verworfen. Dann werden die gekoppelten *Beads* mit den gebundenen Sequenzen zweimal mit 100 µl PBS mit 3 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen. Ab SELEX-Runde 3 werden die Waschschrte sukzessive um einen Schritt erhöht. Anschließend werden die *Beads* in 55 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und für 5 min bei 80°C im Heizblock zum Abspalten der bindenden Sequenzen erhitzt. Der erhaltene Überstand, der jetzt die bindenden Sequenzen enthält, wird mit Hilfe des Magnethalters separiert und kann nun in die Amplifikation eingesetzt werden.

#### 3.5.1.4. Amplifikation

Im Fall einer DNA-Bibliothek werden die bindenden Sequenzen in diesem Schritt durch eine einfache PCR vervielfältigt. Wird dagegen eine RNA-Bibliothek verwendet, muss diese zunächst revers transkribiert werden, bevor die Amplifikation mittels PCR stattfinden kann. Reverse Transkription und PCR-Amplifikation erfolgen in einer „Ein-Topf-Reaktion“ (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, „RT-PCR“). Vor Beginn eines neuen Zyklus werden die amplifizierten Sequenzen wieder in RNA transkribiert.

Aus Abbildung 4.36 kann die Lage der Primer in Bezug auf das zu amplifizierende Oligonukleotid entnommen werden. Die randomisierte Region wird von konstanten Primer-Regionen am 5′ und am 3′-Ende flankiert. Der 5′-Primer enthält die Promotor-Sequenz der T7-Polymerase, sodass diese Polymerase genutzt werden kann, um die Sequenz von DNA in RNA im Zuge einer Transkription umzuschreiben.

#### Reverse Transkription und PCR-Amplifikation

50 µl	Eluat aus SELEX-Runde	Programm:			
		Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
26,0 µl	H <sub>2</sub> O				
5,0 µl	5x PCR-Puffer	1	54°C	10 min	1
6,0 µl	MgCl <sub>2</sub>	2	95°C	1 min	
3,0 µl	dNTPs	3	60°C	1 min	6-12
1,0 µl	Aptamer for	4	72°C	1,5 min	
1,0 µl	Aptamer rev	5	72°C	3 min	1
4,0 µl	5x First Strand Buffer				
2,0 µl	100 mM DTT				
1,0 µl	Superscript II RT				
1,0 µl	Taq-Polymerase				

## Methoden

---

Bei dieser Reaktion werden die dNTPs in einer Konzentration von je 10 mM und die Primer mit einer Konzentration von 100 pmol/μl eingesetzt.

Nach der PCR wird das Produkt in der Agarosegel-Elektrophorese überprüft und anhand der Bandenintensität abgeschätzt, ob die Ausbeute direkt in die Transkription eingesetzt werden kann oder ob noch weiter amplifiziert werden muss.

### Transkription

10 μl	PCR-Produkt (s.o.)
37,0 μl	H <sub>2</sub> O
20,0 μl	5x TK-Puffer
15,0 μl	100 mM MgCl <sub>2</sub>
10,0 μl	NTPs (je 25 mM)
5 μl	100 mM DTT
1 μl	RNasin
2 μl	T7-Polymerase

Inkubation für 15 min bei 37°C im Wasserbad.

Alternativ erfolgt die Transkription mit dem *MAXIscript* oder *MEGAscript T7 Transcription Kit* nach Angaben des Herstellers.

Für die folgende SELEX-Runde werden 20 μl des Transkriptionsprodukts eingesetzt und wiederum zu 80 μl ungekoppelter Beads gegeben, sodass mit einer folgenden Selektion ein neuer SELEX-Zyklus beginnen kann.

### 3.5.2. Filterbindungsassay

Mit Hilfe des Filterbindungsassays, auch Filterretentionsassay genannt, lassen sich Interaktionen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren überprüfen. Als Filter verwendet man eine negativ geladene Nitrocellulosemembran an welche Proteine, die eine überwiegend positive Nettoladung besitzen, immobilisiert werden können. Nukleinsäuren, die aufgrund ihres Phosphatrückgrats negativ geladen sind, binden dagegen nicht an die Membran. Sind die Nukleinsäuren dagegen aber an Proteine gebunden, werden sie ebenfalls von der Membran zurückgehalten. Für den Assay müssen die Nukleinsäuren markiert werden. Eine

Möglichkeit ist die radioaktive Markierung, sodass im Zuge der Transkription z.B. radioaktiv markiertes [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-GTP eingebaut wird.

Die Transkription mit radioaktiv markierten Nukleotiden erfolgt wie in Abschnitt 3.5.1.4 beschrieben mit der Ausnahme, dass zusätzlich noch heißes GTP hinzugefügt wird. Die Aufreinigung der transkribierten RNA erfolgt mit dem *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* nach Herstellerangaben. Das Prinzip der Aufreinigung entspricht dem des *GeneJET Gel Extraction Kit*. Der Erfolg der Transkription wird in einem Urea-PAGE-Gel kontrolliert (*Rotiphorese DNA-Sequenzierungssystem*), welches in TBE-Puffer läuft.

Für den eigentlichen Assay werden folgende Komponenten als Bindepuffer zusammenpipettiert ( $\Sigma$  20  $\mu\text{l}$ ):

2,5 $\mu\text{l}$	10x PBS
0,75 $\mu\text{l}$	100 mM $\text{MgCl}_2$
2,5 $\mu\text{l}$	10 mg/ml BSA
1 $\mu\text{l}$	Transkriptionsprodukt
13,25 $\mu\text{l}$	$\text{H}_2\text{O}$

Dieser Bindepuffer wird dann in die *wells* einer 96-*well*-Platte vorgelegt und 5  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Proteinverdünnung hinzugefügt. Es folgt eine Inkubation für 30 min bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wird der Ansatz auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Dies erfolgt mit Hilfe einer Dot-Blot-Einheit, in welche zuerst eine zuvor in Wasch-Puffer inkubierte Lage Whatmanpapier und dann die bereits für 15 min in Membran-Puffer inkubierte Nitrocellulosemembran übereinander eingespannt werden. Diese Einheit wird dann an eine Unterdruchpumpe angeschlossen. In folgender Reihenfolge wird der Ansatz auf die Membran gegeben: 1x Waschen mit 200  $\mu\text{l}$  Wasch-Puffer, Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes, 4x Waschen mit je 200  $\mu\text{l}$  Wasch-Puffer. Zum Schluss wird die so behandelte Membran in Folie eingeschlagen, in eine Filmkassette eingelegt und in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition erfolgt bei -80°C und die Entwicklung des Röntgenfilms in einer Entwicklermaschine.

### 3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt unter Anwendung des Computerprogramms *EXCEL*. Dabei wird folgende Formel angewendet: TTEST (Matrix1;Matrix2;Seiten;Typ) und ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt (Seiten: 2; Typ: 2). Die Signifikanz der p-Werte wurde wie folgt markiert:

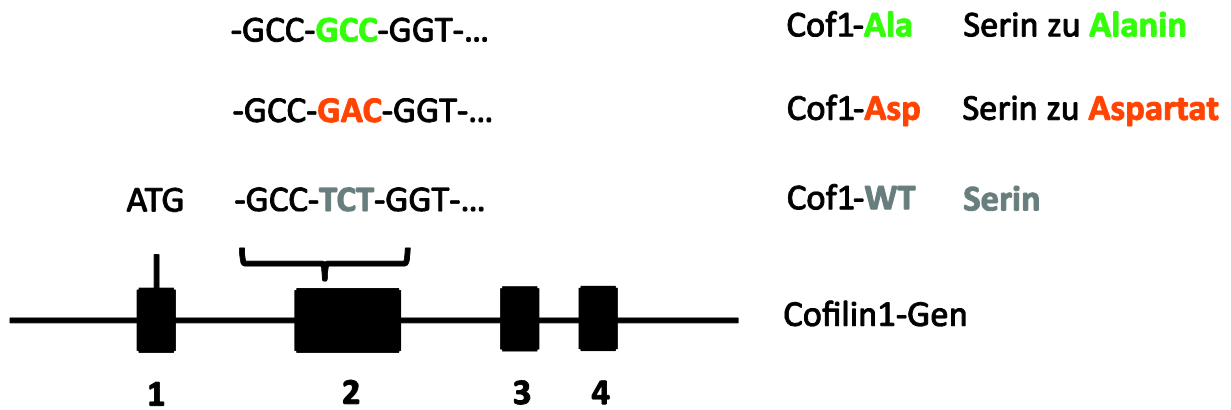
p-Wert > 0,5	→	nicht signifikant (n.s.)
p-Wert = 0,01-0,05	→	*
p-Wert = 0,001-0,01	→	**
p-Wert < 0,001	→	***

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Untersuchungen zur Cofilin1-Aktivität *in vitro*

#### 4.1.1. Ein Tripletaustausch im Exon2 des Cofilin1-Gens führt zu konstitutiv aktivem bzw. inaktivem Protein

Die Regulation der Aktivität von Cofilin1 wird unter anderem durch den Phosphorylierungsstatus der Aminosäure Serin3, die im Exon 2 des Cofilin1-Gens kodiert wird, bestimmt. In seinem aktiven Zustand ist Cofilin1 dephosphoryliert. Durch Phosphorylierung wird es inaktiviert und ist weder in der Lage F- noch G-Aktin zu binden, sodass es keine Aktivität mehr gegenüber Aktin ausüben kann. (MORIYAMA et al., 1996) Zur Untersuchung der Auswirkung des Phosphorylierungsstatus von Cofilin1 in Bezug auf Aktin, wurde auf zwei verschiedene Mutanten zurückgegriffen, die für konstitutiv aktives bzw. inaktives Cofilin1 kodieren (NAGAOKA et al., 1996). Konstitutiv aktives Cofilin1 wird durch den Austausch von Serin zu Alanin erhalten (Cof1-Ala). Die Aminosäure Alanin besitzt im Gegensatz zu Serin keine Hydroxylgruppe und kann somit nicht phosphoryliert werden. Durch den Austausch von Serin gegen Aspartat entsteht dagegen konstitutiv inaktives Cofilin1 (Cof1-Asp). Aufgrund seiner weiteren Carboxylgruppe, die einer Phosphatgruppe ähnelt, imitiert Aspartat eine Phosphorylierung. In Abbildung 4.1 ist der Tripletaustausch im Cofilin1-Gen schematisch dargestellt.



**Abbildung 4.1: Der Triplettaustausch im Exon 2 des Cofilin1-Gens führt zu konstitutiv aktivem bzw. inaktivem Cofilin1.** Bei der konstitutiv aktiven Mutation ist das Serin3 durch Alanin ersetzt, in der konstitutiv inaktiven durch Aspartat.

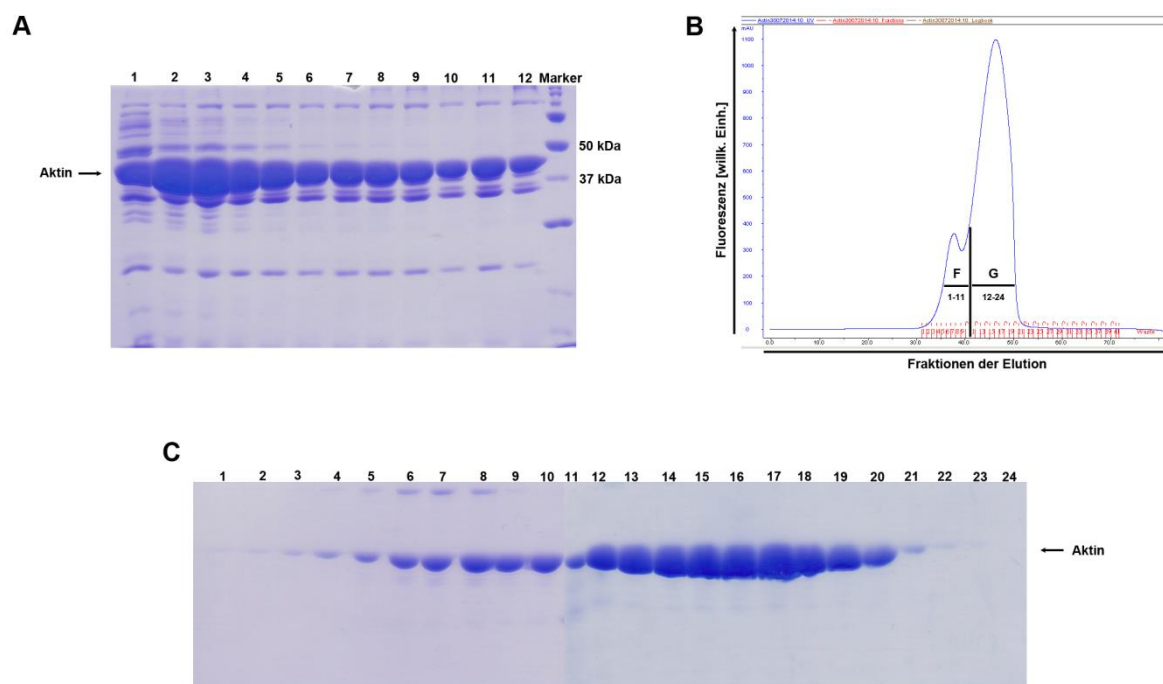
Für die Überexpression der beiden Cofilin1-Mutanten und des Cofilin1-WTs wurden die Sequenzen in GST-Überexpressionsvektoren (pGEX-2T-Cofilin1-Ala, pGEX-2T-Cofilin1-Asp, pGEX-2T-Cofilin1, siehe Anhang) kloniert und in *E. coli* transformiert.

#### 4.1.1.1. Aufreinigung von Aktin und rekombinanten Cofilin1-Proteinen

Für die folgenden Aktivitätsstudien wurde Aktin aus Aktin-Aceton-Puder aufgereinigt. Weiterhin wurden die beiden mutierten Cofilin1-Proteine, als auch die WT-Form rekombinant exprimiert und ebenfalls aufgereinigt.

##### 4.1.1.1.1. Aktinaufreinigung

Die Aufreinigung von alpha-Aktin erfolgte aus Aktin-Aceton-Puder, welches aus Skelettmuskel von Kaninchen hergestellt wurde. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

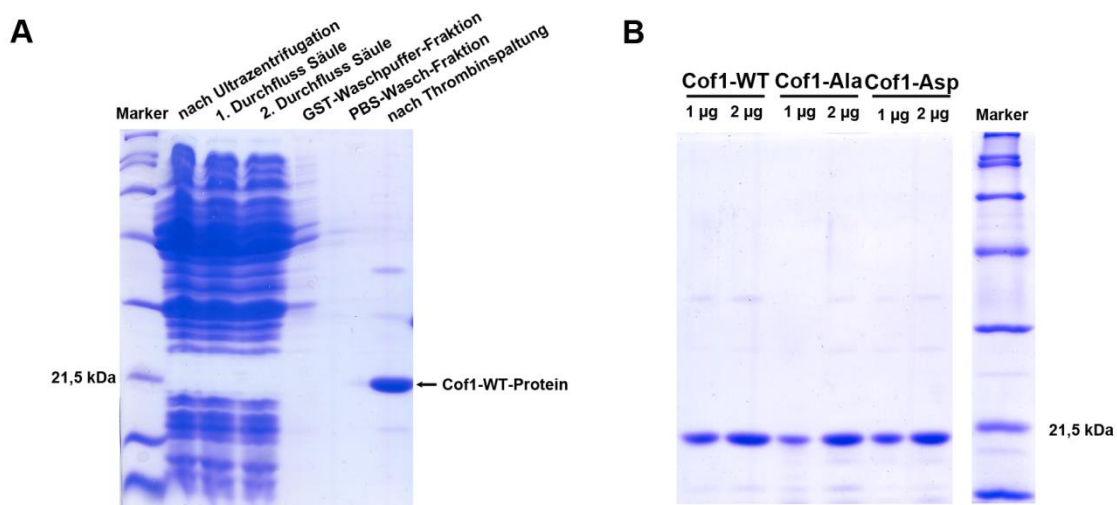


**Abbildung 4.2: Aufreinigung von Aktin aus Aktin-Aceton-Puder.** (A) Fraktionen (1-12) der Aktin-Extraktion nach *Cheese-Cloth*-Filtration im Coomassie-Gel. (B) Mit Hilfe der Äkta-FPLC wurde G- von F-Aktin getrennt. Hier ist das FPLC-Elutionsprofil der Aktinaufreinigung gezeigt. Der erste Peak stellt das F- (Fraktionen 1-11), der zweite das G-Aktin (Fraktionen 12-24) dar. (C) Zur Überprüfung der einzelnen Fraktionen wurde ein Coomassie-Gel angefertigt. Die Laufhöhe des Aktins bei ca. 42 kDa ist jeweils mit einem Pfeil markiert.

Zunächst wurde das rehydrierte Aktin über einen Filter aus *Cheese-Cloth* gegeben, um es von groben Verunreinigungen zu trennen. Nach diesem Schritt hatte man 12 Fraktionen, in denen noch starke Kontaminationen durch andere Proteine vorlagen, erkennbar an Banden ober- und unterhalb der 42 kDa großen Aktinbande. Durch weitere Polymerisations- und Depolymerisationsschritte erhielt man G-Aktin, welches zwar überwiegend in seiner monomeren Form vorlag, allerdings auch noch geringe Mengen an F-Aktin enthielt. Um das für die folgenden Assays störende F-Aktin und andere Proteine zu entfernen, wurde die Aktinlösung mit Hilfe der Äkta-FPLC gelfiltriert. Das Elutionsprofil zeigt zwei *Peaks*, wobei der erste das F-Aktin darstellt. Die Aktin-Filamente können schneller die Gelmatrix passieren als die Monomere, weil sie, im Gegensatz zum G-Aktin, nicht von den Poren der Gelmatrix zurückgehalten werden. Der zweite Peak dokumentiert die Elution des G-Aktins. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der 24 erhaltenen Fraktionen zeigt, dass die ersten noch eine Kontamination durch ein Protein bei ca. 100 kDa enthalten, alle weiteren aber ausschließlich Aktin aufweisen. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Fraktionen 12-20 vereinigt.

### 4.1.1.1.1. Cofilin1-Aufreinigung

Zur Aufreinigung der Cofilin1-Proteine wurden Kulturen mit *E. coli*, die jeweils Vektoren für die Expression von Cofilin1-WT-, Cofilin1-Ala- und Cofilin1-Asp-Protein enthalten, angeimpft, induziert und kultiviert. Die Proteine sind mit einem N-terminalen GST-Tag fusioniert, sodass die überexprimierten Fusionsproteine über Glutathion-Beads aufgereinigt werden konnten. Die Aufreinigung erfolgte mittels Affinitäts-Chromatographie über eine mit Glutathion-Agarose befüllte Säule. Abbildung 4.3 zeigt die Aufreinigungsschritte exemplarisch für Cofilin1-WT-Protein und weiterhin alle aufgereinigten Proteine im Vergleich.



**Abbildung 4.3: Aufreinigung rekombinanter Cofilin1-Proteine.** (A) Stufen der Aufreinigung des Cofilin1-WT-Proteins im Coomassie-Gel. Nach der Ultrazentrifugation erhält man das *Cleared*-Lysat, welches zweimal über die Säule, befüllt mit Glutathion-Beads, geschickt wurde. Anschließend wurde die Säule mit Waschpuffer und PBS gewaschen bevor letztendlich das Cof1-WT-Protein mit Thrombin vom GST-Tag abgespalten wurde. (B) Vergleich von Cofilin1-WT-, Cofilin1-Ala- und Cofilin1-Asp-Protein (1 µg/ 2 µg) im Coomassie-Gel. Die beiden Cofilin1-Mutanten wurden auf die gleiche Weise aufgereinigt wie das WT-Protein. Alle aufgereinigten Proteine besitzen eine Größe von ca. 20 kDa.

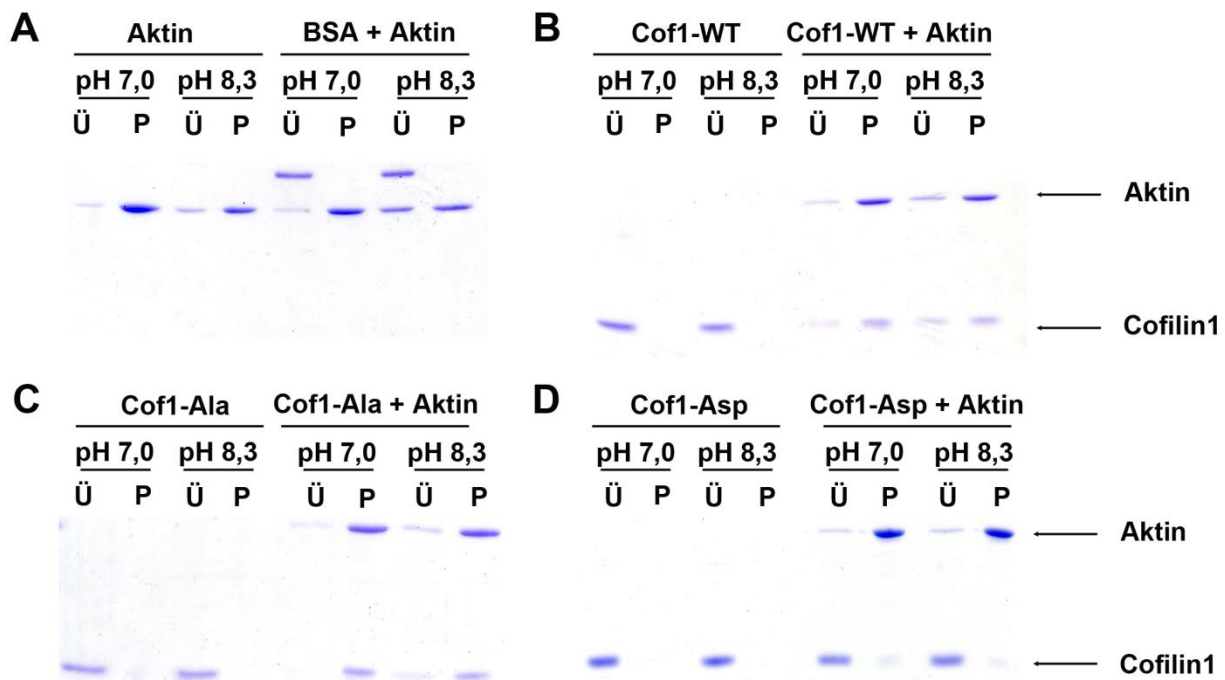
Nach der Überexpression des jeweiligen Fusionsproteins in *E. coli* wurden die Bakterien zunächst lysiert und dann ultrazentrifugiert, sodass man das *Cleared*-Lysat erhielt, welches neben dem gewünschten Fusionsprotein alle anderen löslichen Proteine beinhaltet, die Bakterien besitzen. Dieses wurde anschließend zur affinitätschromatographischen Aufreinigung auf eine Säule, befüllt mit Glutathion-Beads, gegeben, sodass das Fusionsprotein an diese Beads binden konnte und nicht mehr im Durchfluss enthalten war. Durch mehrmaliges Waschen der Säule wurde sichergestellt, dass sich kein anderes außer dem aufzureinigenden Protein auf der Säule befindet. Zuletzt wurde das Fusionsprotein vom



GST-Tag mit Hilfe der Protease Thrombin abgespalten. Sowohl das Cofilin1-WT-Protein, als auch die beiden analogen Proteine Cofilin1-Ala und Cofilin1-Asp wurden auf diese Weise erfolgreich aufgereinigt, was an der Bande bei 20 kDa erkennbar ist.

#### **4.1.1.2. Bindungsstudien mit Hilfe des Aktin-Pelleting-Assays**

Um das Bindungsverhalten des mutierten Cofilin1-Ala- und Cofilin1-Asp-Proteins im Vergleich zum Cofilin1-WT-Protein gegenüber Aktin zu untersuchen, wurde der Aktin-Pelleting-Assay durchgeführt. Nach Inkubation von Aktin mit dem jeweiligen Protein unter polymerisierenden Bedingungen wurde die Probe ultrazentrifugiert, wobei F-Aktin sedimentiert und G-Aktin im Überstand verbleibt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Überstand- und Pelletfraktionen und anschließender Coomassie-Färbung kann eine Aussage getroffen werden, ob das untersuchte Protein an F-Aktin binden kann. Als Kontrollen wurden das Verhalten von Aktin ohne Einfluss eines anderen Proteins, BSA als nicht an Aktin bindendes Kontrollprotein und jeweils die zu untersuchenden Proteine ohne Aktin in der Probe untersucht. In Abbildung 4.4 sind die Ergebnisse der Aktin-Pelleting-Assays zusammengefasst.



**Abbildung 4.4: Untersuchung von Cofilin1-Ala- und Cofilin1-Asp- im Vergleich zu Cofilin1-WT-Protein im Aktin-Pelleting-Assay.** Es wurden 12  $\mu$ M G-Aktin mit 12  $\mu$ M des zu untersuchenden Proteins in den jeweiligen Ansatz gegeben und mit Polymerisationspuffern zwei unterschiedlicher pH-Werte (pH 7,0, pH 8,3) gearbeitet. Die Coomassie-Gele zeigen immer die Überstand- (Ü) und die Pelletfraktion (P) der jeweiligen Probe nach Ultrazentrifugation im Vergleich. (A) Als Kontrolle wurde Aktin und Aktin mit BSA als Kontrollprotein eingesetzt. In den anderen Gelen ist in der linken Hälfte immer als Kontrolle das zu untersuchende Protein ohne Aktin und in der rechten Hälfte die Probe mit Aktin aufgetragen. (B) Cofilin1-WT-Protein ohne / mit Aktin. (C) Cofilin1-Ala-Protein ohne / mit Aktin. (D) Cofilin1-Asp-Protein ohne / mit Aktin.

Die Ergebnisse der Kontrollassays zeigen, dass bei der Probe, die ausschließlich Aktin enthält, der überwiegende Anteil erwartungsgemäß als F-Aktin im Pellet vorzufinden ist. Dies ist bei dem Polymerisationspuffer mit einem pH-Wert von 7,0 am deutlichsten der Fall, da Aktin bei niedrigeren pH-Werten besser polymerisiert. Weiterhin weist bei der BSA-Kontrolle nur der Überstand BSA-Protein auf, was deutlich macht, dass allein durch die Polymerisation von Aktin nicht an Aktin bindende Proteine auch nicht mit ins Pellet gezogen werden. Die Untersuchungen mit dem Cofilin1-WT-Protein zeigen, dass es in Abwesenheit von Aktin im Überstand verbleibt. Gibt man allerdings Aktin hinzu, ist der überwiegende Anteil im Pellet zu finden. Bei dem Polymerisationspuffer mit einem pH-Wert von 8,3 ist etwas weniger Cofilin1-WT-Protein im Pellet als bei niedrigerem. Da bei einem niedrigeren pH-Wert mehr F-Aktin vorliegt, kann mehr Cofilin1 an das Filament binden. Das Cofilin1-Ala-Protein verhält sich analog zu dem Cofilin1-WT-Protein. Bei niedrigem pH-Wert ist sogar der komplette Protein-Anteil im Pellet zu finden. Das Cofilin1-Asp-Protein ist dagegen fast ausschließlich im Überstand lokalisiert. Zwischen den Polymerisationspuffern besteht bei diesem Protein kein Unterschied.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass das konstitutiv aktive Cofilin1-Ala-Protein eine ähnlich starke Affinität für F-Aktin aufweist, wie das Cofilin1-WT-Protein, während das konstitutiv inaktive Cofilin1-Asp-Protein nahezu gar nicht an Aktinfilamente bindet.

#### **4.1.1.3. Aktivitätsstudien mit Hilfe des Pyren-Aktin-Assays**

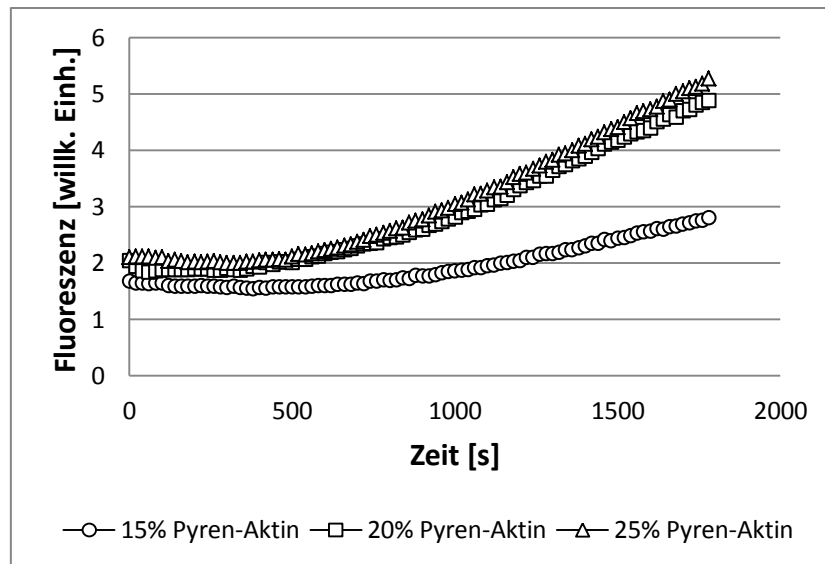
Mit Hilfe des Pyren-Aktin-Assays kann man den Einfluss Aktin bindender Proteine auf die Kinetik von Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation untersuchen. Pyren-Aktin hat die Eigenschaft, dass beim Einbau in Filamente aufgrund des *Stacking Effects* seine Fluoreszenz zunimmt, weshalb durch Fluoreszenzmessung Polymerisations- und Depolymerisations-Effekte beobachtet werden können. Zur Untersuchung der Auswirkung des mutierten Cofilin1-Ala- und Cofilin1-Asp-Proteins auf die Aktinkinetik im Gegensatz zu Cofilin1-WT-Protein wurde der Pyren-Aktin-Assay durchgeführt.

##### **4.1.1.3.1. Vorversuche zu den Pyren-Aktin-Assays**

Für die Etablierung der Assays wurde im Vorfeld das ideale Verhältnis von Pyren-Aktin und unmarkiertem Aktin als auch die optimale Latrunculin B-Konzentration ermittelt, da beide Komponenten zu unerwünschten Sekundäreffekten führen können. Die idealen Aktin-Konzentrationen wurden einer vorangegangenen Arbeit entnommen (ASCHMANN, 2010). In allen folgenden Pyren-Aktin-Assays wurde Polymerisationspuffer mit einem pH-Wert von 7,0 verwendet.

##### **4.1.1.3.1.1. Pyrenaktin-Anteil**

Pyren-Aktin hat zwar keinen Einfluss auf die Kinetik der Aktin-Polymerisation (COOPER et al., 1983), dennoch sollte der Anteil des markierten an unmarkiertem Aktin so gering wie möglich gehalten werden, da es einen Einfluss auf die Bindung Aktin bindender Proteine an Aktin haben kann. Dazu wurde in einem Vorversuch der optimale Pyrenaktin-Anteil im Polymerisations-Assay ermittelt (siehe Abbildung 4.5).

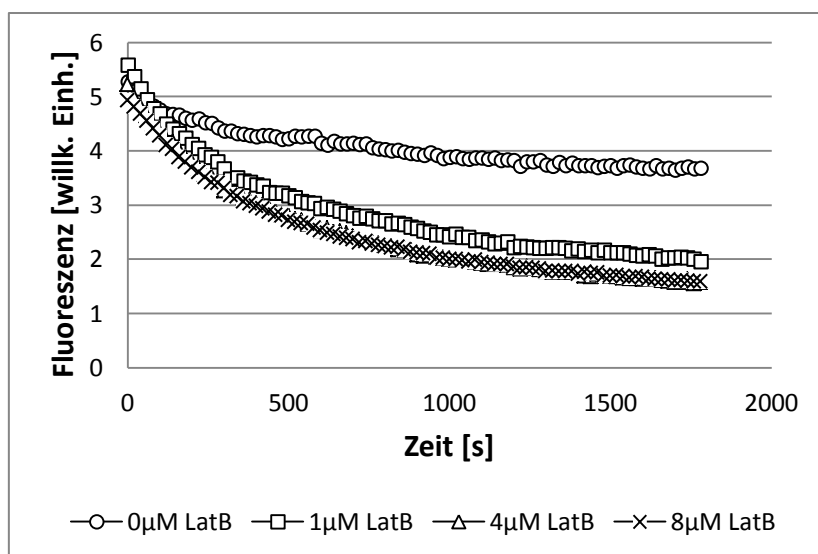


**Abbildung 4.5: Ermittlung des optimalen Pyren-Aktin-Anteils.** Dazu wurden 3  $\mu\text{M}$  G-Aktin mit einem ansteigenden Pyren-G-Aktin-Anteil inkubieren gelassen und die Fluoreszenz über die Zeit gemessen.

Bei einem Pyren-Aktin-Anteil von 15 % erfolgt der Anstieg der Kurve erst später als bei den beiden höheren Anteilen, was darauf zurückzuführen ist, dass weniger markiertes Aktin vorhanden und somit die Fluoreszenz niedriger ist. Der Unterschied zwischen einem Anteil von 20 % und 25 % ist minimal, der Kurvenverlauf ist sehr ähnlich. Deshalb wurde für alle folgenden Versuche ein Pyren-Aktin-Anteil von 20 % gewählt.

### 4.1.1.3.1.2. Latrunculin-Konzentration

Depolymerisationsassays wird Latrunculin B hinzugefügt, welches in einem eins-zu-eins Verhältnis irreversibel monomeres Aktin bindet (MORTON et al., 2000). Dies ist essentiell, um das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der Depolymerisation zu halten. Andernfalls würde durch das Ansteigen der G-Aktin-Konzentration ab einem bestimmten Zeitpunkt die kritische Konzentration für das Wachstum am langsam wachsenden Minus-Ende erreicht sein, sodass die Depolymerisation verlangsamt bzw. ganz zum Erliegen käme. Aus diesem Grund wurde die ideale Latrunculin B-Konzentration für einen Depolymerisations-Assay in einem Vorversuch erhoben (siehe Abbildung 4.6).

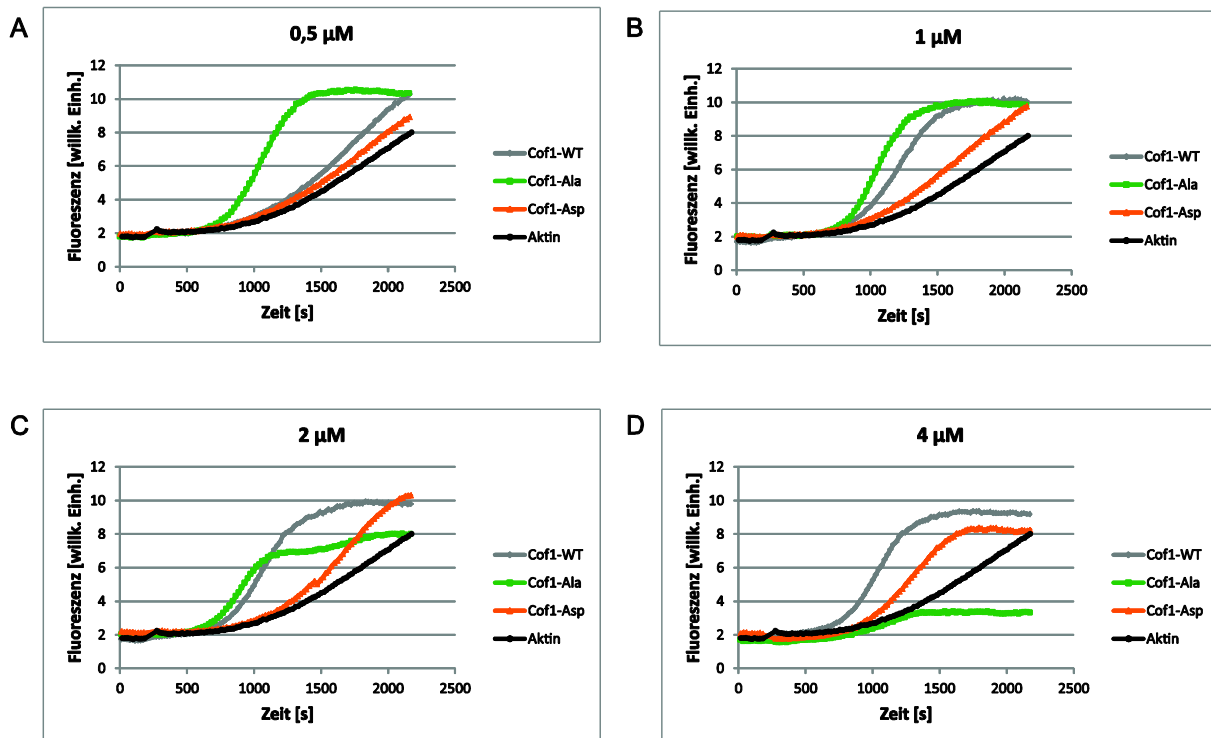


**Abbildung 4.6: Ermittlung der idealen Latrunculin B-Konzentration.** Hierzu wurden 1  $\mu\text{M}$  F-Aktin (20 % Pyren-Aktin) mit ansteigenden Latrunculin B-Konzentrationen (LatB) inkubieren gelassen und die Fluoreszenz über die Zeit gemessen.

Die Zugabe von Latrunculin B führt zu einem stärkeren Abfall der Kurve als ohne dessen Beigabe, da das Reaktionsgleichgewicht durch seine Anwesenheit in Richtung Depolymerisation verschoben wird. Dies ist bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Latrunculin B bereits zu beobachten und bei höheren Konzentrationen noch stärker ausgeprägt. Zwischen einer Zugabe von 4  $\mu\text{M}$  und 8  $\mu\text{M}$  ist kein Unterschied zu beobachten. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Versuche eine Latrunculin B-Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  verwendet.

#### 4.1.1.3.2. Polymerisations-Assay

In diesem Assay wurde G-Aktin (3  $\mu\text{M}$  mit einem Pyren-Aktin-Anteil von 20 %) mit den zu untersuchenden Proteinen, Cof1-Ala-, Cof1-Asp- und Cof1-WT-Protein, unterschiedlicher Konzentration (0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ ) zusammengefügt und die Polymerisation über die Zeit anhand der Zunahme der Pyren-Aktin Fluoreszenz ermittelt. Abbildung 4.7 zeigt die Ergebnisse des Polymerisations-Assays.



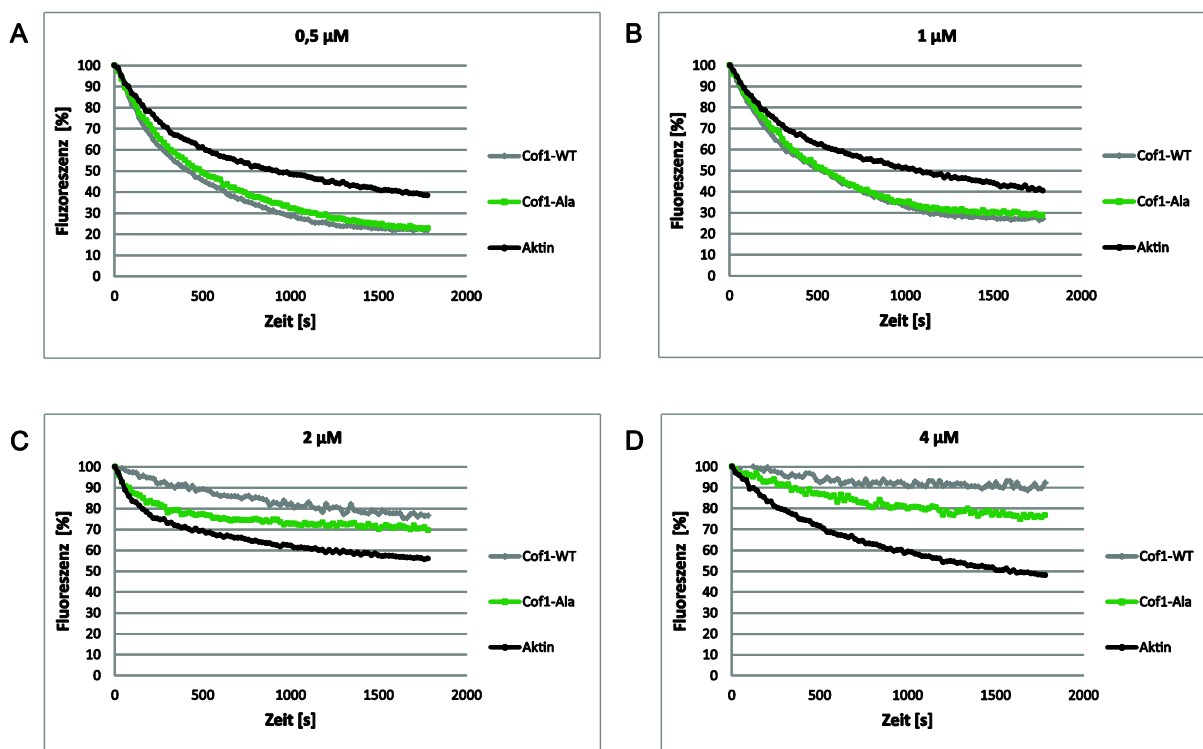
**Abbildung 4.7: Untersuchung von Cof1-Ala- und Cof1-Asp- im Vergleich zu Cof1-WT-Protein im Pyren-Aktin-Polymerisationsassay.** Es wurden 3 µM G-Aktin (20 % Pyren-Aktin) mit jeweils 0,5 µM, 1 µM, 2 µM und 4 µM des entsprechenden Proteins in den jeweiligen Ansatz gegeben. (A-D) Die Diagramme zeigen einen Vergleich der Kurven bei jeweils einer der vier Protein-Konzentrationen.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass durch das Cof1-Ala-Protein der früheste Fluoreszenzanstieg erreicht wird und sich bereits schon bei einer Konzentration von 0,5 µM ein sigmoidaler Kurvenverlauf zeigt. Dies ist auch für die Konzentration von 1 µM der Fall. Bei einer Konzentration von 2 µM Cof1-Ala-Protein zeigt die Kurve ebenfalls den klassischen Verlauf einer Sättigungskurve, allerdings folgt der Plateauphase ein weiterer leichter Anstieg. Die Kurve bei der höchsten Konzentration von 4 µM steigt zunächst kurz an, bleibt dann aber im Plateau. Das Cof1-WT-Protein führt erst ab einer Konzentration von 1 µM zu einem Sättigungskurvenverlauf, welcher auch bei den beiden folgenden Konzentrationen vorliegt. Durch das Cof1-Asp-Protein wird erst ab einer Konzentration von 4 µM die Sättigungsphase erreicht und dies im Hinblick auf die Zeit auch deutlich später als bei den anderen beiden Proteinen. Die Aktin-Kontrolle erreicht diese Phase nicht.

Dies führt zu dem Schluss, dass alle drei Cofiline die Aktinpolymerisation begünstigen. Dieser Effekt ist bei der konstitutiv aktiven Mutante am stärksten, gefolgt vom Cofilin1-WT-Protein. Das konstitutiv inaktive Cofilin1-Asp-Protein zeigt erst sehr spät eine begünstigende Wirkung auf die Polymerisation von Aktin.

#### 4.1.1.3.3. Depolymerisations-Assay

Im Depolymerisations-Assay wurde F-Aktin ( $1\ \mu\text{M}$  einem Pyren-Aktin-Anteil von 20 %) und  $4\ \mu\text{M}$  Latrunculin B mit unterschiedlichen Konzentrationen ( $0,5\ \mu\text{M}$ ,  $1\ \mu\text{M}$ ,  $2\ \mu\text{M}$ ,  $4\ \mu\text{M}$ ) der zu untersuchenden Proteine, Cof1-Ala- und Cof1-WT-Protein, zusammengefügt und die Abnahme der Fluoreszenz über die Zeit ermittelt. Die Ergebnisse des Depolymerisations-Assays sind in Abbildung 4.8 zusammengestellt.



**Abbildung 4.8: Untersuchung von Cof1-Ala- im Vergleich zu Cof1-WT-Protein im Pyren-Aktin-Depolymerisationsassay.** Es wurden  $1\ \mu\text{M}$  F-Aktin (20 % Pyren-Aktin) und  $4\ \mu\text{M}$  Latrunculin B mit jeweils  $0,5\ \mu\text{M}$ ,  $1\ \mu\text{M}$ ,  $2\ \mu\text{M}$  und  $4\ \mu\text{M}$  des entsprechenden Proteins in den jeweiligen Ansatz gegeben. (A-D) Die Diagramme zeigen einen Vergleich der Kurven bei jeweils einer der vier Protein-Konzentrationen. Aufgrund stark variierender Ausgangsfluoreszenzen wurden die erhaltenen Werte normalisiert, wobei jeweils der Startwert auf 100 % und die folgenden Werte entsprechend ins Verhältnis gesetzt wurden.

Die Betrachtung der Ergebnisse zeigt, dass durch das Cof1-Ala- als auch durch das Cof1-WT-Protein die Fluoreszenz deutlich gesenkt wird. Dieser Effekt ist bei den beiden niedrigsten Proteinkonzentrationen von  $0,5\ \mu\text{M}$  und  $1\ \mu\text{M}$  am stärksten ausgeprägt. Bei einer Konzentration von  $2\ \mu\text{M}$  unterscheidet sich der Effekt der beiden Proteine leicht voneinander. Während das Cof1-Ala-Protein die Fluoreszenz senkt, zeigt das Cof1-WT-Protein dies nur noch minimal. Bei der höchsten Konzentration von  $4\ \mu\text{M}$  beeinflussen die Proteine die Fluoreszenz nur kaum noch. Die Werte sind normalisiert dargestellt, da die

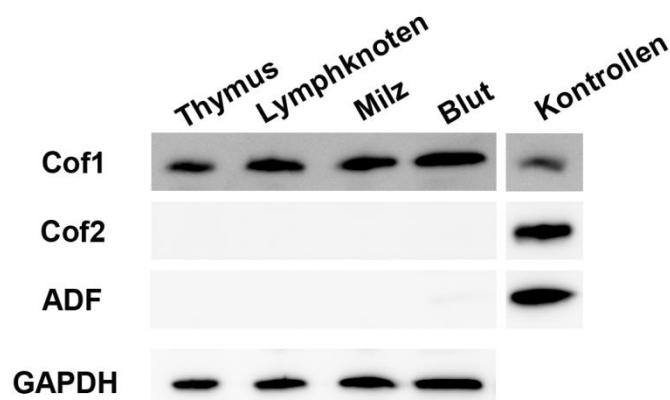
Ausgangsfluoreszenzen, vermutlich aufgrund von *Quenching*-Effekten durch die Proteine, sehr stark variieren. Dieser Effekt nimmt mit steigender Proteinkonzentration zu. Für die Normalisierung wurde jeweils der erste gemessene Wert auf 100 % und die folgenden Werte entsprechend ins Verhältnis gesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden Cofiline die Aktindepolymerisation auf eine ähnlich starke Weise fördern. Dies ist insbesondere bei den beiden niedrigsten Konzentrationen deutlich zu sehen.

### 4.2. Die ADF/Cofilin-Familie in Thymozyten und T-Zellen

Nachdem bislang die *in vitro*-Aktivität von Cofilin1 im Mittelpunkt der Untersuchungen stand, wird nun der Fokus auf die Funktion *in vivo* gelegt. Im Folgenden wurde die Expression der einzelnen Mitglieder der ADF/Cofilin-Proteinfamilie in Thymozyten und T-Zellen analysiert, da in den weiteren Versuchen die Bedeutung von Cofilin1 in diesen Zellen näher untersucht werden soll. Dazu wurden Thymozyten und T-Zellen aus Lymphknoten, Milz und Blut von WT-Mäusen durch Zerkleinerung der ganzen Organe gewonnen. Da in den peripheren lymphatischen Organen neben T-Zellen noch weitere Immunzellen vorliegen, wurden die T-Zellen mit der MACS-Technologie mit Hilfe des panT-Kits über Depletion von den anderen Zellen separiert. Der Erfolg der MACS-Zellseparation wurde über eine extrazelluläre Färbung mit dem FACS-Antikörper CD3ε, der gegen eine Komponente des T-Zellrezeptors gerichtet ist, und anschließende durchflusszytometrische Untersuchung überprüft. Aus den erhaltenen Einzelzellsuspensionen wurden dann die Proteine extrahiert. Die Proteinlysate wurden einer Westernblot-Analyse unterzogen, wobei mit Antikörpern gegen Cofilin1, Cofilin2 und ADF geprobt wurde (siehe Abbildung 4.9).





**Abbildung 4.9: Expression der ADF/Cofilin-Proteinfamilie in lymphatischen Organen.** Westernblot-Analyse von Thymozyten und T-Zellen aus Lymphknoten (98 %), Milz (90 %) und Blut (80 %) mit Antikörpern gegen Cofilin1 (KG60-Antikörper, Kontrolle: Hirn), Cofilin2 (FHU1-Antikörper, Kontrolle: Muskel) und ADF (7D10-Antikörper, Kontrolle: Uterus). Zur Ladekontrolle wurde mit GAPDH geprobt. (In Klammern ist jeweils der Reinheitsgrad der T-Zellen als prozentualer Anteil an der Probe angegeben. Es wurden jeweils drei Organe zusammengefasst.)

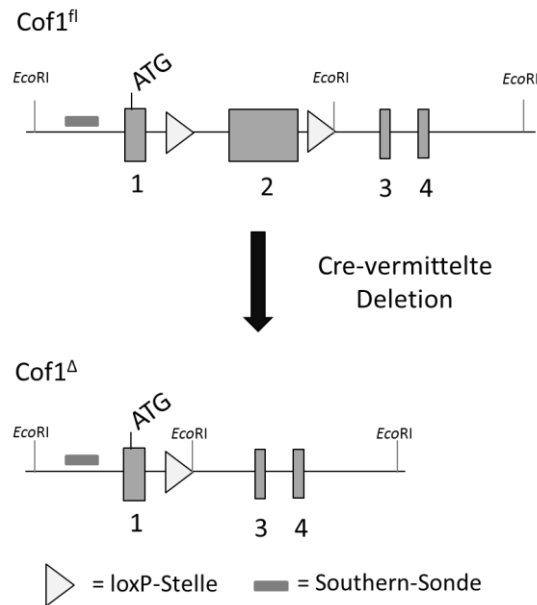
Die Westernblot-Analyse liefert jeweils ein deutliches Signal für Cofilin1 in Thymozyten und T-Zellen aus Lymphknoten, Milz und Blut. Mit den Antikörpern gegen Cofilin2 und ADF erhält man dagegen keine Banden. Die Ergebnisse zeigen, dass Cofilin1 das einzige Mitglied der ADF/Cofilin1-Proteinfamilie darstellt, das in Thymozyten und T-Zellen exprimiert wird.

### 4.3. Bedeutung von Cofilin1 für T-Zellen *in vivo*

Von *in vitro*-Untersuchungen ist bekannt, dass Cofilin1 nicht nur eine Rolle bei der Migration von T-Zellen, sondern auch bei der Aktivierung dieser Zellen und der Bildung der immunologischen Synapse spielt (SAMSTAG et al., 2013). Deshalb wurde im Folgenden die Bedeutung von Cofilin1 für T-Zellen *in vivo* näher untersucht.

#### 4.3.1. Cofilin1-Deletion während der T-Zell-Entwicklung mit Hilfe der CD4-Cre- und der distalLck-Cre-Mauslinie

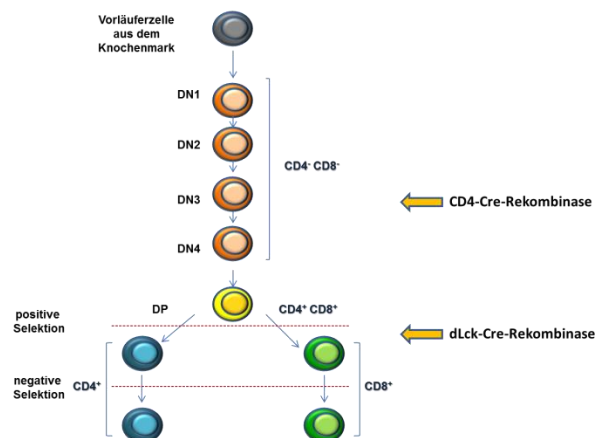
Cofilin1 spielt eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung. Ein KO des Proteins führt letztendlich zu einem Defekt beim Schließen des Neuralrohrs und ist embryonal letal (GURNIAK et al., 2005). Um dies zu umgehen und den KO von Cofilin1 in T-Zellen untersuchen zu können, wurde auf ein konditionales Mausmodell zurückgegriffen (vgl. Abbildung 4.10).



**Abbildung 4.10: Rekombinationsschema des konditionalen Cofilin1-Mausmodells.** In dieser Mauslinie ist das Exon 2 des Cofilin1-Gens durch loxP-Stellen flankiert, sodass dieses nach Cre-vermittelter Deletion herausgeschnitten und das Cofilin1-Gen nicht mehr exprimiert wird. Weiterhin ist auch die Lage der *EcoRI*-Schnittstellen und die Lage der Southern-Sonde, die in der 5'-UTR-Region des Cofilin1-Gens bindet, in der Abbildung markiert.

Das Cofilin1-Gen umfasst 4 Exons, wobei das Exon 1 nur das Startcodon beinhaltet. In dieser Mauslinie wird das Exon 2 von loxP-Stellen flankiert, welches über Cre-vermittelte Deletion entfernt werden kann und dann eine Leserasterverschiebung hervorruft. Dadurch wird die Translation verfrüht abgebrochen und das Cofilin1-Protein kann nicht transkribiert werden. Durch den Einsatz gewebespezifischer Cre-Rekombinasen kann somit die Expression von Cofilin1 gezielt deletiert werden.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Deletion mit Hilfe der CD4-Cre-Rekombinase von Cofilin1 während einer frühen Phase der T-Zellentwicklung im Thymus zu einer Blockade der Reifung führt und somit keine T-Zellen heranreifen, die in die peripheren lymphatischen Organe emigrieren (SALZ, 2011). Für den KO von Cofilin1 in reifen, einfach positiven T-Zellen wird daher eine Cre-Rekombinase benötigt, die in einer späten Phase der T-Zellreifung aktiv ist. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit die distalLck-Cre-Rekombinase verwendet (ZHANG et al., 2005). Abbildung 4.11 zeigt schematisch die T-Zellreifung im Thymus und die Phasen, zu welchen die genannten Cre-Rekombinasen aktiv sind.

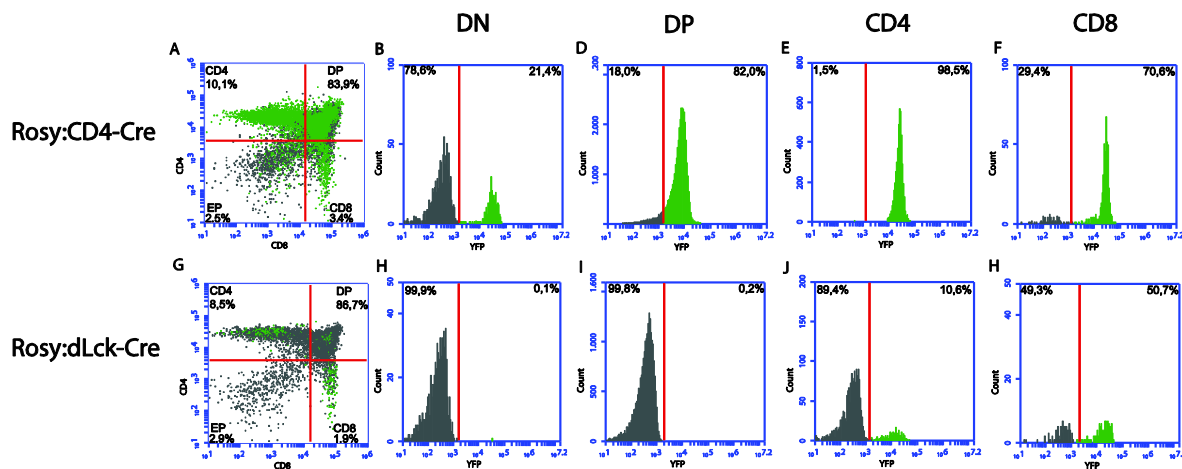


**Abbildung 4.11: Cre-vermittelte Deletion zu verschiedenen Phasen der T-Zellreifung im Thymus.** Die CD4-Cre-Rekombinase deletiert während der DN3-Phase, während die distalLck-Cre-Rekombinase hingegen ihre Aktivität im Anschluss an die positive Selektion zeigt.

Die Entwicklung der T-Zellen erfolgt aus Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark stammen, in den Thymus einwandern und über vier doppelte negative Stadien (DN1-DN4) hin zu doppelt positiven Thymozyten (DP) heranreifen. Darauf folgt die positive Selektion, wobei die Thymozyten weiter vermehrt werden, die körpereigene MHC-Moleküle erkennen können. Dann erfolgt die negative Selektion, wobei Thymozyten eliminiert werden, die körpereigene Antigene erkennen, bevor die T-Zellen als reife, einfach positive Zellen in die Peripherie auswandern. Die Bezeichnung der Stadien bezieht sich auf die Expression der beiden Co-Rezeptoren CD4 und CD8. Die CD4-Cre-Rekombinase (CD4-Cre) zeigt ihre Aktivität in der DN3-Phase, während die distalLck-Cre-Rekombinase (dLck-Cre) erst nach der positiven Selektion aktiv ist.

#### 4.3.1.1. Rosy-Reportermäuse-Untersuchungen belegen die Aktivität der verwendeten-Cre-Rekombinasen

Zur Analyse der Aktivität der CD4- und der dLck-Cre-Rekombinase im Hinblick auf den Zeitpunkt während der T-Zellreifung im Thymus wurden Cre-Mäuse mit Rosy-Reportermäusen gekreuzt. In Rosy-Reportermäusen befindet sich stromabwärts des ROSA26-Promotors eine gefloxtete Stopp-Kassette gefolgt von der kodierenden Region des eYFP-Gens. Eine Cre-vermittelte Rekombination führt zur Deletion der Stopp-Kassette und zur Expression des eYFP-Reportergens (SRINIVAS et al., 2001), welches dann in allen Zellen exprimiert wird, in denen die Cre-Rekombinase aktiv war. Für die Untersuchung wurden Thymozyten, sowohl von Rosy:CD4-Cre-, als auch von Rosy:dLck-Cre-Mäusen gewonnen, mit

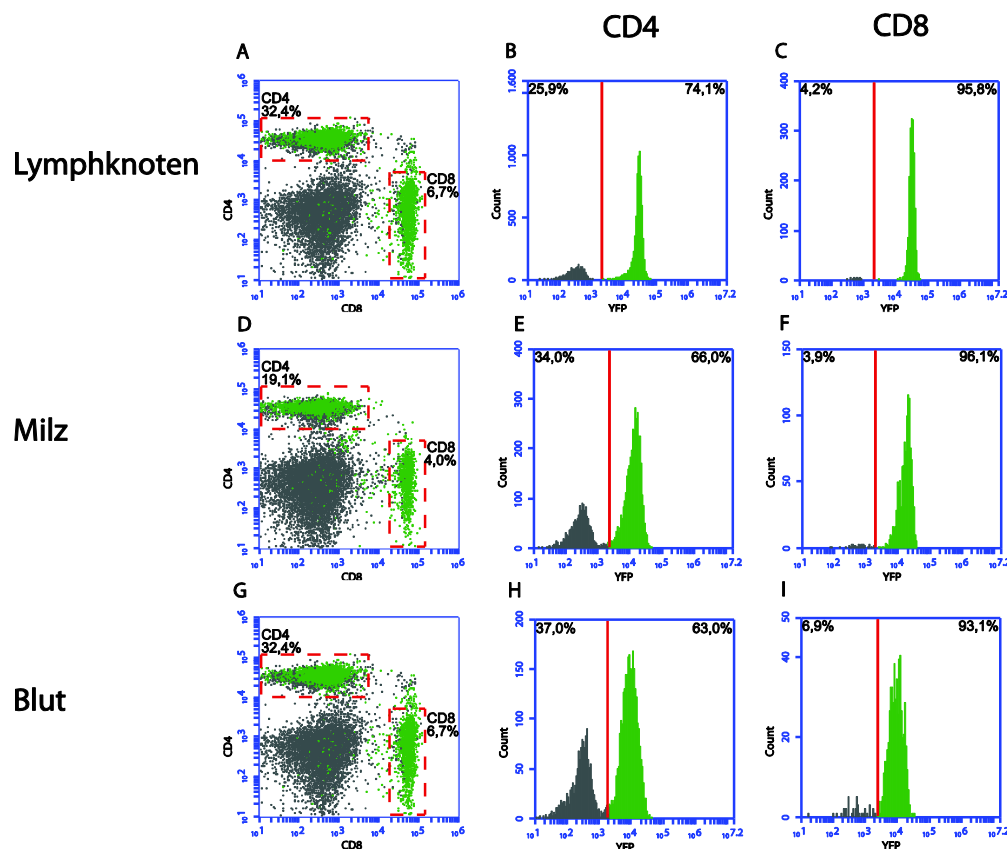


**Abbildung 4.12: Vergleich der Aktivität der CD4- und der dLck-Cre-Rekombinase in Thymozyten mit Hilfe der Rosy-Reportermaus.** Thymozyten von Rosy:CD4-Cre- und Rosy:dLck-Cre-Mäusen wurden mit Immunfluoreszenzmarkern für CD4 und CD8 gefärbt und mit dem Durchflusszytometer untersucht. Dabei wurde auf die Thymozyten *gegatet*. In grün sind jeweils die YFP-positiven Zellen dargestellt, während in grau alle nicht rekombinierten Zellen abgebildet sind. Die Dotplots zeigen eine Gesamtübersicht über alle Zellen. In den Histogrammen sind die Ergebnisse für die einzelnen Populationen (DN, DP, CD4, CD8) im Thymus aufgeschlüsselt. **(A-E)** zeigt die Resultate für die Rosy:CD4-Cre-Zellen, **(E-J)** für die Rosy:dLck-Cre-Zellen.

Die FACS-Analyse zeigt, dass bei den Thymozyten der Rosy:CD4-Cre-Tiere in der DN-Phase YFP-positive Zellen vorliegen und der Anteil an rekombinierten Zellen ab dieser Phase deutlich zunimmt. Allerdings kommen letztendlich bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verhältnismäßig mehr grüne Zellen vor als bei CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Die Rekombination findet schon in einem DN-Stadium statt, sodass in CD4<sup>+</sup>- als auch in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen Rekombination erfolgt. In den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sind mehr rekombinierte Zellen zu finden, da die Rekombinase unter dem CD4-Promotor exprimiert wird. Bei den Rosy:dLck-Cre-Thymozyten findet man YFP-positive Zellen erst ab der einfach positiven Phase, wobei der Anteil in der CD8<sup>+</sup>-Population fünfmal höher ist als bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Die durch die dLck-Cre vermittelte Rekombination erfolgt erwartungsgemäß später in der T-Zellreifung und ist in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen stärker ausgeprägt, was die Literatur bestätigt (ZHANG et al., 2005).

Da die durch die CD4-Cre-Rekombinase vermittelte Deletion von Cofilin1 zu einer Blockade in der T-Zellreifung führt, wurden nun periphere T-Zellen mit einer Cofilin1-Deletion mit Hilfe der dLck-Cre-Rekombinase erhalten. Um die Rekombination der dLck-Cre-Rekombinase in T-Zellen der Peripherie beurteilen zu können, wurden ebenfalls Zellen aus Lymphknoten, Milz

und Blut der Rosy:dLck-Cre-Tiere, wie im Abschnitt zuvor bereits beschrieben, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 zusammengestellt.



**Abbildung 4.13: Untersuchung der Aktivität der dLck-Cre-Rekombinase in peripheren T-Zellen mittels der Rosy-Reportermaus.** T-Zellen aus Lymphknoten, Milz und Blut von Rosy:dLck-Cre-Mäusen wurden mit Immunfluoreszenzmarkern für CD4 und CD8 gefärbt und mit dem Durchflusszytometer untersucht. Dabei wurde auf die Lymphozyten *gagatet*. In grün sind jeweils die YFP-positiven Zellen dargestellt, während in grau alle nicht rekombinierten Zellen abgebildet sind. Die Dotplots zeigen eine Gesamtübersicht über alle Zellen. In den Histogrammen sind die Ergebnisse für die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aufgeschlüsselt. Es wurde auf die Lymphozyten *gagatet*. In (A-C) sind die Ergebnisse für T-Zellen aus Lymphknoten, in (D-F) für T-Zellen aus Milz und in (G-I) die Ergebnisse für T-Zellen aus Blut dargestellt.

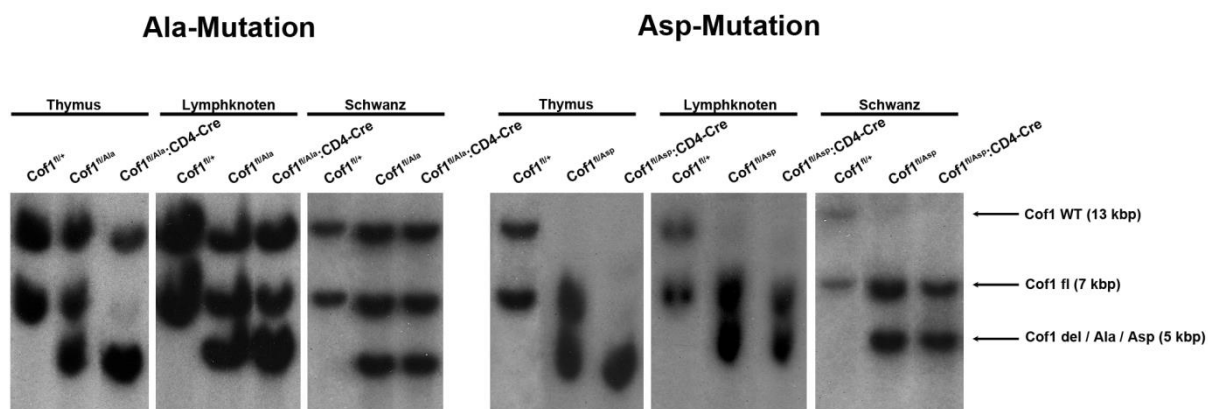
Die Untersuchung der peripheren T-Zellen aus Rosy:dLck-Cre-Tieren zeigt, dass der Anteil an YFP-positiven Zellen in allen lymphatischen Organen sehr hoch ist. Während er in CD4-positiven Zellen bei um die 70 % liegt, ist er bei CD8-positiven Zellen um die 95 % angesiedelt. Eine 100 %ige Deletion ist mit Hilfe des Cre/loxP-Systems nicht möglich.

### 4.3.2. Bedeutung der Cofilin1-Aktivität für T-Zellen

Der bereits beschriebene Tripletaustausch im Cofilin1-Gen führt durch den Ersatz der Aminosäure Serin3 gegen Alanin bzw. Aspartat zu konstitutiv aktivem (Cofilin1-Ala) bzw. inaktivem Protein (Cofilin1-Asp). Diese Mutationen liegen auch als Knock-in-Mäuse (Christine Gurniak) vor, sodass eine Untersuchung der Auswirkungen der Mutation *in vivo* möglich ist. Um den Einfluss der jeweiligen Cofilin1-Mutation gezielt in T-Zellen untersuchen zu können, wurden für diese Studien konditionale  $\text{Cof1}^{\text{fl/fl}}:\text{CD4-Cre}$ -Mäuse mit  $\text{Cof1}^{\text{Ala/+}}$ - bzw.  $\text{Cof1}^{\text{Asp/+}}$ -Mäusen gekreuzt. In den konditionalen Cofilin1-Mäusen wird das Exon 2 des Cofilin1-Gens von zwei loxP-Stellen flankiert (vgl. Abbildung 4.10), sodass durch die Aktivität der CD4-Cre-Rekombinase, welche im DN3-Stadium der T-Zellentwicklung aktiv ist (vgl. Abbildung 4.11), kein Cofilin1 mehr in den Thymozyten der folgenden Reifungsstadien exprimiert wird. Durch die Kreuzung mit den Linien für konstitutiv aktives bzw. inaktives Cofilin1 erhält man Mäuse, die nur dieses mutierte Allel in T-Zellen exprimieren ( $\text{Cof1}^{\text{fl/Ala}}:\text{CD4-Cre}$ ,  $\text{Cof1}^{\text{fl/Asp}}:\text{CD4-Cre}$ ). Von vorausgehenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass heterozygote Mutanten ( $\text{Cof1}^{+/Ala}$ ,  $\text{Cof1}^{+/Asp}$ ) lebensfähig sind und keinen Phänotyp zeigen.

#### 4.3.2.1. Nachweis der Mutationen im Cofilin1-Gen auf DNA-Ebene

Zur Untersuchung der Deletion auf DNA-Ebene wurden von  $\text{Cof1}^{\text{fl/+}}$ - (Kontrolle),  $\text{Cof1}^{\text{fl/Ala}}$ - (Kontrolle),  $\text{Cof1}^{\text{fl/Asp}}$ - (Kontrolle),  $\text{Cof1}^{\text{fl/Ala}}:\text{CD4-Cre}$ - (Ala-Mutante) und  $\text{Cof1}^{\text{fl/Asp}}:\text{CD4-Cre}$ - Tieren (Asp-Mutante) Zellen aus Thymus, Lymphknoten und Schwanz gewonnen, die genomische DNA isoliert und einer Southernblot-Analyse unterzogen. Dabei wurde eine Restriktionsspaltung mit *EcoRI* durchgeführt und eine Sonde verwendet, die zwischen dem Cofilin1-WT-, dem Cofilin1-fl- und dem Cofilin1-del- bzw. Cofilin1-Ala- oder Cofilin1-Asp-Allel unterscheiden kann (vgl. Abbildung 4.10). Das Ergebnis ist in Abbildung 4.14 dargestellt.



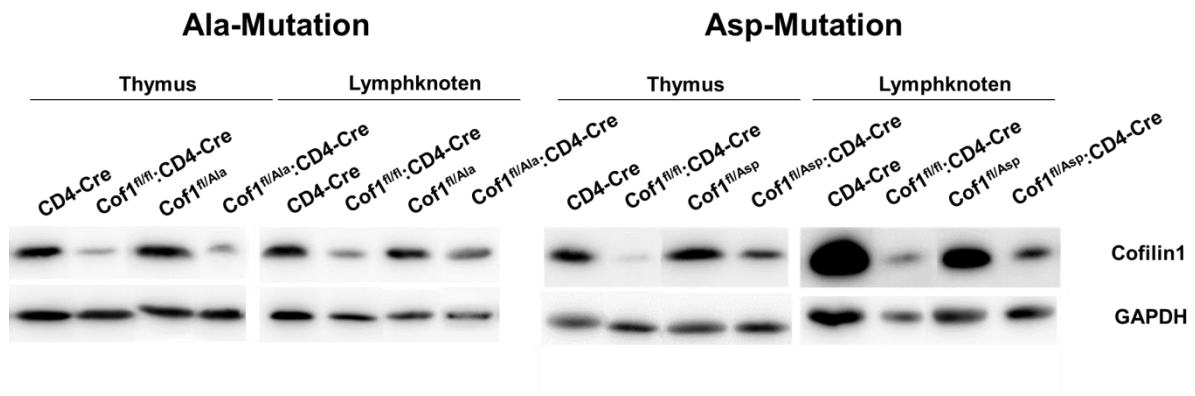
**Abbildung 4.14: Southernblot-Analyse zur Untersuchung der Deletion in der konstitutiv aktiven und inaktiven  $Cof1$ -Mutante.** Analysiert wurden Zellen von  $Cof1^{fl/+}$ ,  $Cof1^{fl/Ala}$ ,  $Cof1^{fl/Asp}$ ,  $Cof1^{fl/Ala};CD4-Cre$  und  $Cof1^{fl/Asp};CD4-Cre$ -Tieren aus Thymus, Lymphknoten und Schwanz. (Die WT-Banden bei den Proben der  $Cof1^{fl/Ala}$ - und  $Cof1^{fl/Ala};CD4-Cre$ -Tiere aller Organe sind unspezifischer Hintergrund.)

Die Analyse zeigt erwartungsgemäß eine nahezu vollständige Deletion des geflochten Cofilin1-Allels mittels der CD4-Cre-Rekombinase in den Thymus-Zellen, sowohl bei der Ala- als auch bei der Asp-Mutante. Daraus kann man folgern, dass in den Thymozyten nur das mutierte Allel exprimiert wird. In den Zellen aus Lymphknoten ist bei der Ala-Mutante die Cofilin1-flox-Bande noch deutlich zu sehen. Bei der Asp-Mutante ist die flox-Bande noch vorhanden, aber im Vergleich zum  $Cof1^{fl/Asp}$ -Kontrolltier schwächer ausgeprägt. Dies lässt darauf schließen, dass in peripheren T-Zellen beider Mutanten neben dem mutierten Allel auch weiterhin das geflochte Allel exprimiert wird. Allerdings ist hier zu vermerken, dass in Lymphknoten neben T-Zellen auch andere Zellen, wie z.B. B-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen und Granulozyten vorkommen, in denen aufgrund der Verwendung der T-Zell-spezifischen CD4-Cre-Rekombinase keine Deletion vorliegen kann. Daher könnte man vermuten, dass auch in diesen Zellen eine Deletion vorliegt, sofern die T-Zellreifung nicht beeinträchtigt ist und die Zellen in die peripheren lymphatischen Organe auswandern können. Bei den Proben aus Schwanz-DNA ist sowohl bei der Ala- als auch bei der Asp-Mutante kein Verschwinden der Cofilin1-flox-Bande und damit keine Rekombination zu verzeichnen, da eine Thymozyten-spezifische Cre-Rekombinase verwendet wurde.

#### 4.3.2.2. Nachweis der Mutationen auf Protein-Ebene

Neben der Untersuchung der Deletion auf DNA-Ebene wurde im Zuge einer Westernblot-Analyse auch die Cofilin1-Proteinexpression in Zellen aus Thymus und Lymphknoten von  $CD4-Cre$  (Kontrolle),  $Cof1^{fl/fl};CD4-Cre$  (KO-Mutante),  $Cof1^{fl/Ala}$  (Kontrolle),  $Cof1^{fl/Asp}$  (Kontrolle),  $Cof1^{fl/Ala};CD4-Cre$  (Ala-Mutante) und  $Cof1^{fl/Asp};CD4-Cre$ -Tieren (Asp-Mutante)

untersucht. Für die Westernblot-Analyse wurden im Gegensatz zum Southern als Kontrollen Mäuse der Genotypen CD4-Cre und  $Cof1^{fl/fl}$ :CD4-Cre dargestellt, da mit diesen der WT- und der KO-Cofilin1-Proteinlevel erfasst werden kann. Für die Untersuchung wurde ein Antikörper gegen Cofilin1 verwendet und zum Abgleich gegen das Haushaltsgen GAPDH geprobt (vgl. Abbildung 4.15).



**Abbildung 4.15: Westernblot-Analyse zur Untersuchung der Deletion in der konstitutiv aktiven und inaktiven Cofilin1-Mutante.** Analysiert wurden Zellen von CD4-Cre-,  $Cof1^{fl/fl}$ :CD4-Cre-,  $Cof1^{fl/Ala}$ -,  $Cof1^{fl/Asp}$ -,  $Cof1^{fl/Ala}$ :CD4-Cre- und  $Cof1^{fl/Asp}$ :CD4-Cre-Tieren aus Thymus und Lymphknoten. Es wurden Antikörper gegen Cofilin1 (KG40-Antikörper) und GAPDH verwendet.

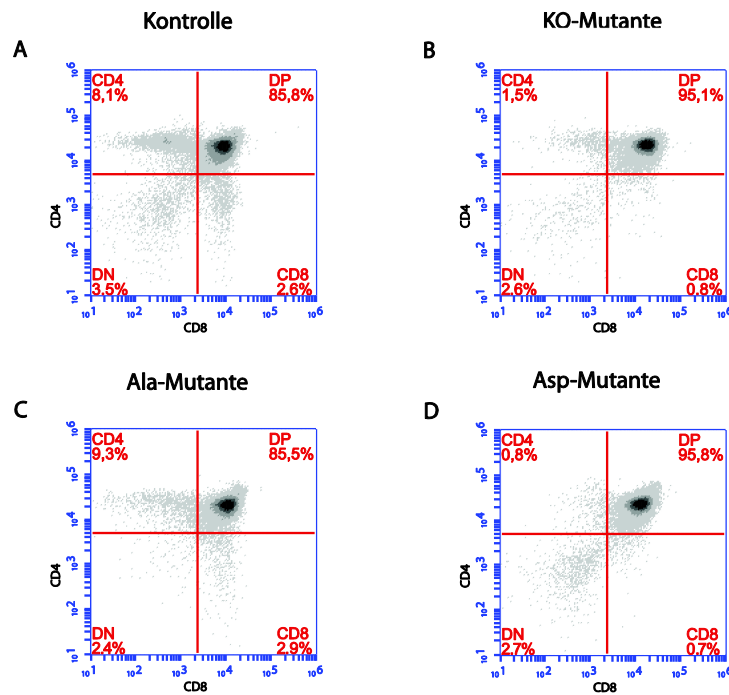
Die Untersuchung Proteinebene zeigt eine starke Reduktion des Cofilin1-Proteins in den Cofilin1-KO-Tieren sowohl in den Zellen aus Thymus als auch aus Lymphknoten im Vergleich zu den Kontrollen, da in diesem Fall eine Deletion auf beiden Allelen des Cofilin1-Gens erfolgt. Das Cofilin1-Signal von  $Cof1^{fl/Ala}$  und  $Cof1^{fl/Asp}$  entspricht im Thymus als auch in den Lymphknoten dem in der CD4-Cre-Kontrolle. In diesen Tieren findet keine Deletion statt, sodass die Expression des Cofilin1-Proteins den WT-Level wiedergibt. Betrachtet man nun die Signale der Ala- und Asp-Mutante in den einzelnen Organen, exprimieren diese mehr Cofilin1 als die Cofilin1-KO-Tiere, aber weniger als die entsprechenden Kontrollen mit einem geflochtenen und einem mutierten Cofilin1-Allel. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Deletion nur auf einem Allel erfolgt. Somit repräsentiert das exprimierte Protein das Cofilin1-Ala- bzw. Cofilin1-Asp-Protein bei diesen Tieren.

#### 4.3.2.3. Für die T-Zellreifung ist konstitutiv aktives Cofilin1 essentiell

Nachdem auf DNA- und Proteinebene gezeigt werden konnte, dass sowohl in der konstitutiv aktiven Ala-Mutante als auch in der konstitutiv inaktiven Asp-Mutante nur das mutierte Allel in Thymozyten exprimiert wird, wurden nun weitere Untersuchungen durchgeführt. Aus



vorhergehenden Studien ist bekannt, dass die homozygote Expression des Asp-Allels zum gleichen Phänotyp wie der Cofilin1-KO und somit zu früher embryonaler Letalität führt. Das konstitutiv aktive Cofilin1 scheint noch stärkere Auswirkungen zu haben, da bisher keine ES-Zellen mit der Ala-Mutation erhalten wurden (persönliche Mitteilung, Christine Gurniak). Zur Analyse des Einflusses des Phosphorylierungsstatus von Cofilin1 auf die Reifung von T-Zellen im Thymus wurden diese durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden aus Thymi von CD4-Cre- (Kontrolle), Cofilin1<sup>fl/fl</sup>:CD4-Cre- (KO-Mutante), Cofilin1<sup>fl/Ala</sup>:CD4-Cre- (Ala-Mutante) und Cofilin1<sup>fl/Asp</sup>:CD4-Cre-Mäusen (Asp-Mutante) Einzelzellsuspensionen angefertigt und extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dabei wurden Marker für CD4- und CD8-positive Zellen verwendet. Mit Hilfe dieser Marker kann man überprüfen, ob sich die Thymozyten im Thymus normal entwickeln. Im Normalfall reifen sie, nachdem sie als Vorläuferzellen den Thymus erreicht haben, über doppelt negative (DN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), doppelt positive (DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) hin zu einfach positiven Zellen (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) heran. Diese Entwicklungsphasen kann man anhand der beiden Marker CD4 und CD8 im FACS-Plot nachvollziehen. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 4.16 zu sehen.



**Abbildung 4.16: Durchflusszytometrische Untersuchung von Thymozyten in der konstitutiv aktiven und inaktiven Cof1-Mutante.** Thymozyten von CD4-Cre- (Kontrolle) (A), Cofilin1<sup>fl/fl</sup>:CD4-Cre- (KO-Mutante) (B), Cofilin1<sup>fl/Ala</sup>:CD4-Cre- (Ala-Mutante) (C) und Cofilin1<sup>fl/Asp</sup>:CD4-Cre-Mäusen (Asp-Mutante) (D) wurden mit Immunfluoreszenzmarkern für CD4 und CD8 gefärbt und mit dem Durchflusszytometer untersucht. Dabei wurde auf die Thymozyten *gagatet*. (jeweils zwei unabhängige Experimente, n = 4)

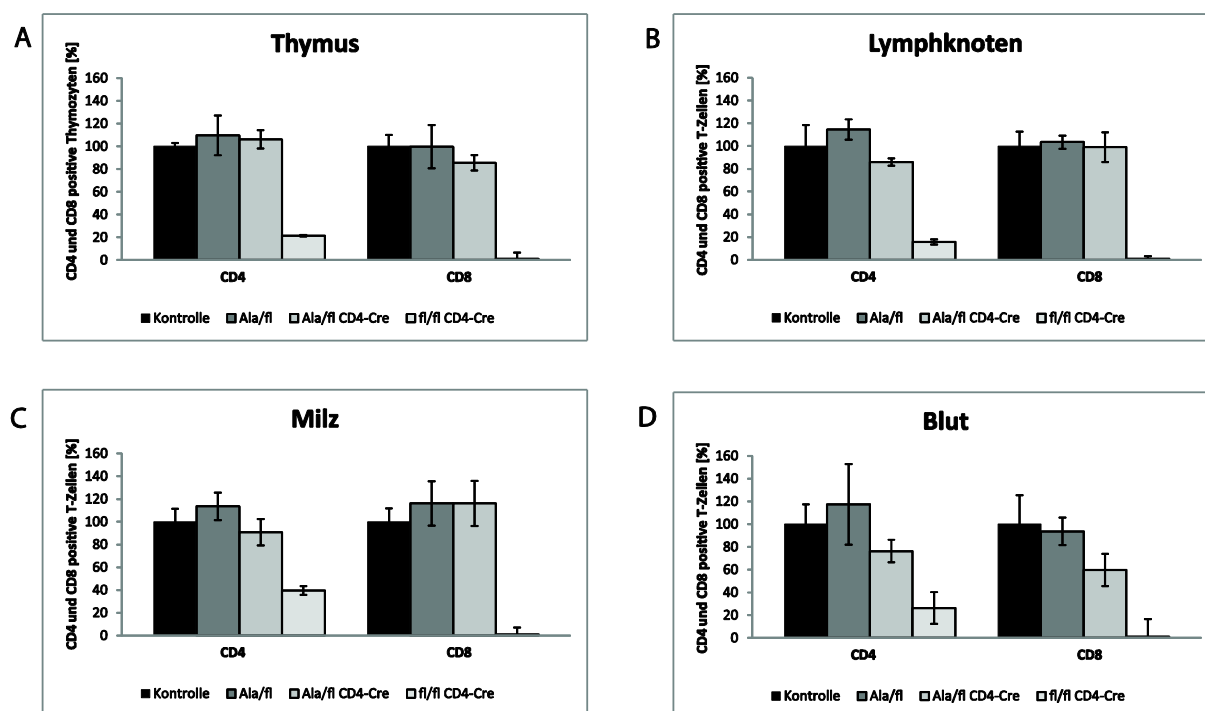
Betrachtet man die Reifung der Thymozyten der konstitutiv aktiven Ala-Mutante, entspricht diese der Kontrolle. Sie verläuft über das DN- hin zum DP-Stadium und endet letztendlich bei reifen T-Zellen, die den Thymus verlassen können. Die konstitutiv inaktive Asp-Mutante dagegen bildet, genau wie die KO-Mutante, keine einfach positiven Zellen aus. Beide Tiere weisen einen erhöhten Anteil an Thymozyten im DP-Stadium auf.

#### 4.3.2.4. Reife T-Zellen mit konstitutiv aktivem Cofilin1 emigrieren aus dem Thymus in das periphere lymphatische System

Da bei der Asp-Mutante die Thymozyten nicht das Stadium der einfach positiven Zellen erreichen und somit potentiell keine reifen T-Zellen in die Peripherie emigrieren, wurden die weiteren Untersuchungen auf die Ala-Mutante eingegrenzt.

Um zu überprüfen, ob konstitutiv aktives Cofilin1 einen Einfluss auf das Auswandern der T-Zellen aus dem Thymus in die peripheren lymphatischen Organe hat, wurden weiterhin die CD4- und CD8-positiven Zellen nicht nur aus Thymus, sondern auch aus den peripheren lymphatischen Organen von CD4-Cre- (Kontrolle), Cofilin1<sup>fl/Ala</sup>-, Cofilin1<sup>fl/Ala</sup>:CD4-Cre- und Cofilin1<sup>fl/fl</sup>:CD4-Cre-Mäusen untersucht. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen aus Thymus,

Lymphknoten, Milz und Blut hergestellt und einer Färbung für die Marker CD4 und CD8 unterzogen (vgl. Abbildung 4.17).



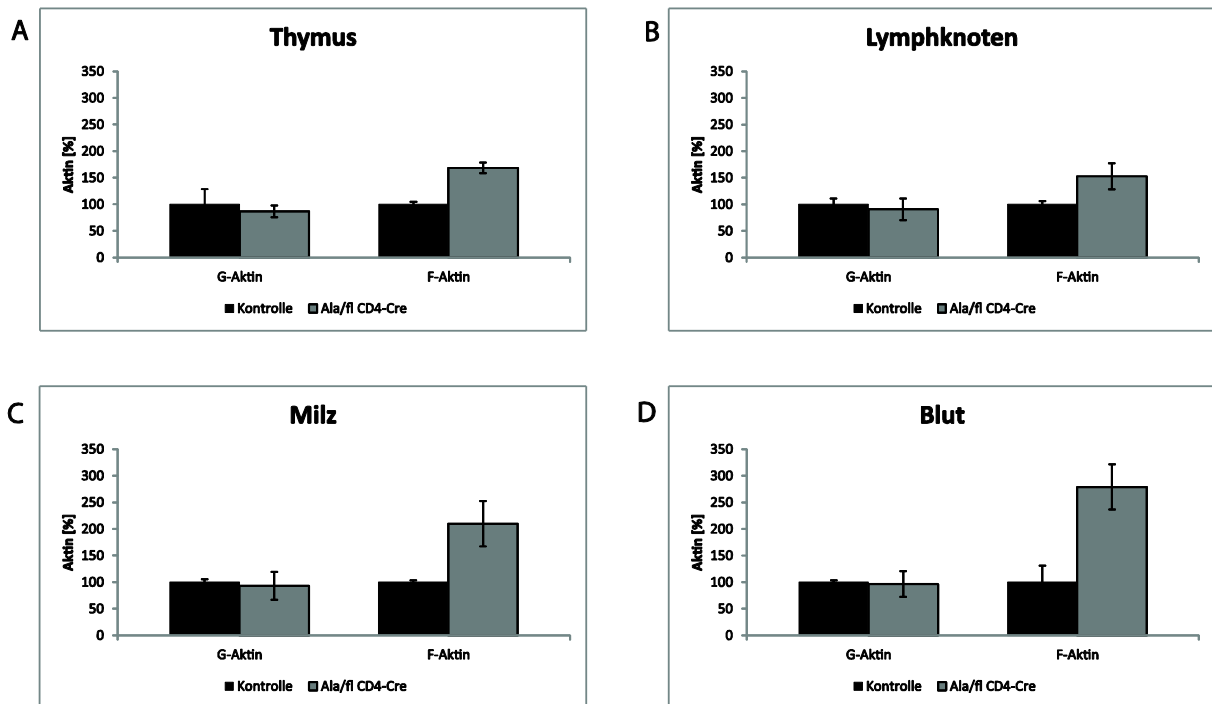
**Abbildung 4.17: Analyse von CD4- und CD8-positiven Zellen im Thymus und in den peripheren lymphatischen Organen der Ala-Mutante.** Thymozyten (A) und Einzelzellen aus Lymphknoten (B), Milz (C) und Blut (D) von CD4-Cre<sup>-</sup>, Cofilin1<sup>fl</sup>/Ala<sup>-</sup>, Cofilin1<sup>fl</sup>/fl:CD4-Cre<sup>-</sup> und Cofilin1<sup>fl</sup>/Ala:CD4-Cre-Mäusen wurden mit Immunfluoreszenzmarkern für CD4 und CD8 gefärbt und mit dem Durchflusszytometer untersucht. Dabei wurde auf die Lymphozyten gegatet. Für die Auswertung wurde der Anteil CD4- bzw. CD8-positiver Zellen der Kontrolle auf 100 % und die Werte der anderen Genotypen dazu ins Verhältnis gesetzt. (zwei unabhängige Experimente, n = 4)

Die Analyse der CD4- und CD8-positiven Zellen der Ala-Mutante zeigt, dass sowohl der Anteil der CD4- als auch der Anteil der CD8-Zellen in der Mutante in keinem der untersuchten Organe deutlich von dem der Kontrollen abweicht.

#### 4.3.2.5. In Thymozyten und reifen T-Zellen mit konstitutiv aktivem Cofilin1 ist der F-Aktinlevel erhöht

Weiterhin wurde der Aktinstatus im Thymus und in den peripheren lymphatischen Organen von Cof1<sup>Ala/fl</sup>:CD4-Cre<sup>-</sup> und CD4-Cre-Tieren untersucht. Es ist bekannt, dass das Aktinzytoskelett nicht nur eine Rolle bei der Migration von T-Zellen spielt, sondern auch eine wichtige Funktion bei der Ausbildung der immunologischen Synapse besitzt (DUSTIN, COOPER, 2000). Eine konstitutive Aktivität von Cofilin1 und gegebenenfalls dadurch veränderte Aktinlevel können somit möglicherweise einen starken Einfluss auf die Funktion der T-Zellen

haben. In den *in vitro*-Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich das Cofilin1-Ala-Protein sehr ähnlich gegenüber Aktin verhält wie das Cofilin1-WT-Protein. Zur Überprüfung der Auswirkung von Cofilin1-Ala-Protein auf Aktin in T-Zellen wurden die gewonnenen Zellen aus CD4-Cre- (Kontrolle) und Cof1<sup>fl/Ala</sup>:CD4-Cre-Mäusen (Ala-Mutante) einer intrazellulären Immunfluoreszenzfärbung mit den FACS-Farbstoffen DNaseI, welcher an G-Aktin bindet, und Phalloidin, der an F-Aktin bindet, unterzogen (siehe Abbildung 4.18).



**Abbildung 4.18: Untersuchung des Aktinstatus im Thymus und in den peripheren lymphatischen Organen der Ala-Mutante.** Thymozyten (A) und Einzelzellen aus Lymphknoten (B), Milz (C) und Blut (D) von CD4-Cre- (Kontrolle) und Cofilin1<sup>fl/Ala</sup>:CD4-Cre-Mäusen wurden mit Immunfluoreszenzmarkern für G- (DNaseI) und F-Aktin (Phalloidin) gefärbt und mit dem Durchflusszytometer untersucht. Dabei wurde auf die Thymozyten bzw. Lymphozyten *gatatet*. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Fluoreszenz für G- bzw. F-Aktin der Kontrolle auf 100 % und die Werte der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt. (zwei unabhängige Experimente, n = 4)

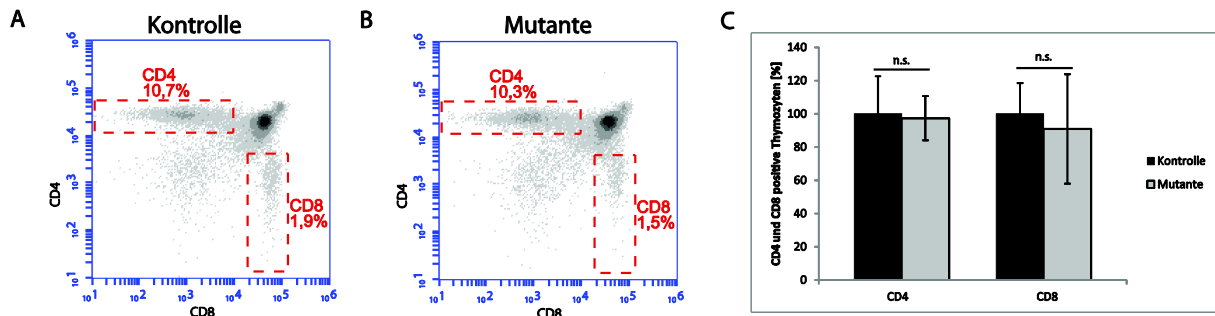
Die Analyse des Aktinstatus zeigt, dass der G-Aktin-Level in der Ala-Mutante im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert ist. Dagegen ist der F-Aktin-Gehalt in der Mutanten deutlich erhöht. Dies ist im Thymus der Fall und auch in den Lymphknoten zeigt sich eine leichte Erhöhung. In der Milz ist der F-Aktinlevel um 100 % erhöht, während im Blut sogar eine Erhöhung um 200 % vorliegt.

### **4.3.3. Die T-Zellreifung nach Ausschalten von Cofilin1 in einer späten Phase der T-Zell-Entwicklung**

Wie bereits beschrieben, führt eine frühe Deletion von Cofilin1 mittels der CD4-Cre-Rekombinase im DN3-Stadium der T-Zellentwicklung zu einer Blockade bei der Reifung, sodass die Zellen sich nicht über das doppelt positive Stadium hinaus entwickeln. Um zu prüfen, ob das Ausschalten von Cofilin1 in einer späteren Reifungsphase kurz nach der positiven Selektion der Thymozyten mittels der dLck-Cre-Rekombinase ebenfalls die Entwicklung der T-Zellen beeinflusst, wurden verschiedene Untersuchungen mit diesen Thymozyten durchgeführt.

#### **4.3.3.1. Thymozyten mit Cofilin1-Deletion reifen zu einfach positiven Zellen heran**

Um zu prüfen, ob bei einer Deletion von Cofilin1 durch die dLck-Cre-Rekombinase die T-Zellreifung beeinflusst wird, wurde auch hier eine Färbung mit den Markern gegen CD4 und CD8 und eine anschließende durchflusszytometrische Analyse von Thymozyten durchgeführt. Dazu wurden  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}$ :dLck-Cre-Tiere als Mutante verwendet, während dLck-Cre-Mäuse als Kontrolle dienten. Für die Analyse wurden Tiere mit einem bereits deletierten und einem geflochten Cofilin1-Allel verwendet, um sicherzustellen, dass nicht nur eine heterozygote Deletion erfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.19 anhand von Plots und als statistische Auswertung dargestellt.



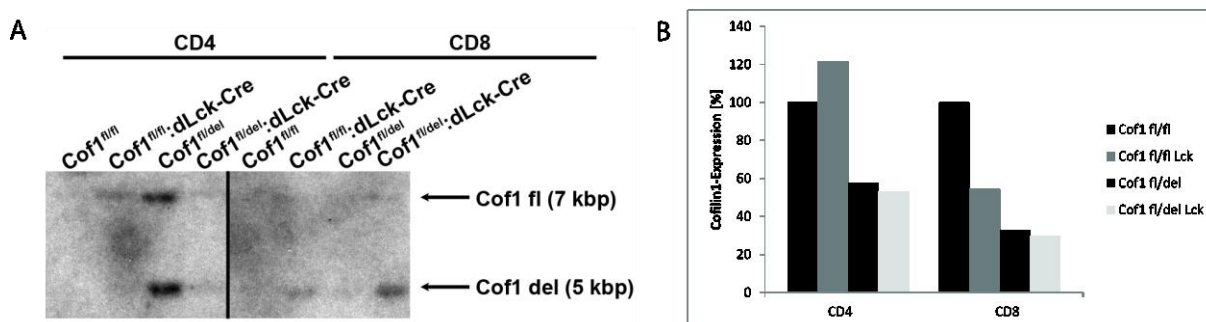
**Abbildung 4.19: Durchflusszytometrische Untersuchung von einfach positiven Thymozyten mit Cofilin1-Deletion vermittelt durch die dLck-Cre-Rekombinase.** Thymozyten von dLck-Cre- (Kontrolle) (A) und Cofilin1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre-Mäusen (Mutante) (B) wurden mit Immunfluoreszenzmarkern für CD4 und CD8 gefärbt und mit dem Durchflusszytometer untersucht. Dabei wurde auf die Thymozyten *gagatet*. (C) Für die statistische Auswertung wurde der Anteil CD4- bzw. CD8-positiver Zellen der Kontrolle auf 100 % und die Werte der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Signifikanz der Abweichung von Kontrolle zu Mutante wurde mittels t-Test bestimmt. (drei unabhängige Experimente, n = 6)

Die Ergebnisse zeigen sowohl für die CD4- als auch für die CD8-positiven Thymozyten einen leicht verminderten Anteil bei den Mutantenzellen, welcher aber nicht signifikant ist. Eine Cofilin1-Deletion in einer späten Phase der T-Zellreifung im Thymus hat somit keinen Einfluss auf deren Entwicklung zu einfach positiven T-Zellen.

#### 4.3.3.2. Überprüfung der Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase in einfach positiven Thymozyten auf DNA- und Protein-Ebene

Um auf DNA und Protein-Ebene eine durch die dLck-Cre-Rekombinase vermittelte Cofilin1-Deletion in einfach positiven Thymozyten nachzuweisen, wurden die Thymozyten einer MACS-Zellseparation unterzogen, um Zellproben zu erhalten, die ausschließlich CD4- bzw. CD8-positive Zellen enthalten. Zur Gewinnung von CD4-Zellen wurde das Thymozyten-Gemisch zunächst einer Markierung mit magnetischen CD8-Antikörpern unterzogen, sodass an der Säule sowohl doppelt positive (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) und einfach positive Zellen für CD8 zurückgehalten wurden. Im Durchfluss waren dann die CD4-einfach positiven als auch die doppelt negativen Zellen enthalten. Nun wurde eine Markierung mit magnetischen CD4-Antikörpern durchgeführt, um mit Hilfe einer weiteren Säule die einfach positiven Zellen für CD4 von den restlichen Zellen zu trennen. Zum Erhalt von CD8-einfach positiven Zellen wurde diese MACS-Strategie analog verwendet. Die Reinheit der isolierten Fraktionen wurde über eine Färbung mit den FACS-Antikörpern gegen CD4 und CD8 und anschließende durchflusszytometrische Untersuchung bestimmt. Für die Analyse wurden Thymozyten aus

Cof1<sup>fl/fl</sup>:dLck-Cre- und Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre-Tieren als Mutanten sowie Zellen aus Cof1<sup>fl/fl</sup>- und Cof1<sup>fl/del</sup>-Mäusen als Kontrollen verwendet. Im Gegensatz zu den FACS-Analysen wurden hier auch Tiere untersucht, deren Cofilin1-Gen homozygot gefloxt ist. Dieser Genotyp eignet sich besser für eine Southern-Blot-Analyse, da hier nicht von vorne herein ein del-Allel vorliegt und somit das Auftreten dieses Allels direkt auf eine erfolgte Deletion schließen lässt. Der Genotyp Cof1<sup>fl/fl</sup> zeigt die WT-Situation, während Cof1<sup>fl/del</sup>, den heterozygoten Zustand widerspiegelt. Für die Southernblot-Analyse wurde ein Restriktionsverdau mit *EcoRI* durchgeführt und eine Sonde verwendet, die zwischen dem Cofilin1-fl- und dem Cofilin1-del-Allel unterscheiden kann (vgl. Abbildung 4.10). Weiterhin wurde mit denselben gemachten Zellen eine Westernblot-Analyse durchgeführt und mit Antikörpern gegen Cofilin1 (KG60-Antikörper) und GAPDH geprobt. Für die Auswertung wurden die Bandenstärken quantifiziert und die Werte gegen den Abgleich verrechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.20 dargestellt.



**Abbildung 4.20: Southernblot- und Westernblot-Analyse Thymozyten mit Cofilin1-Deletion vermittelt durch die dLck-Cre-Rekombinase.** Untersuchung von Proben mit CD4- und CD8-positiven Thymozyten folgender Reinheit: CD4<sup>+</sup> Cof1fl/fl (CD4-T-Zellen: 86 %), CD4<sup>+</sup> Cof1fl/fl:dLck-Cre (CD4-T-Zellen: 86 %), CD4<sup>+</sup> Cof1fl/del (CD4-T-Zellen: 81 %), CD4<sup>+</sup> Cof1fl/del:dLck-Cre (CD4-T-Zellen: 78 %); CD8<sup>+</sup> Cof1fl/fl (CD8-T-Zellen: 50 %), CD8<sup>+</sup> Cof1fl/fl:dLck-Cre (CD8-T-Zellen: 77 %), CD8<sup>+</sup> Cof1fl/del (CD8-T-Zellen: 75 %), CD8<sup>+</sup> Cof1fl/del:dLck-Cre (CD8-T-Zellen: 63 %). (In Klammern ist jeweils der Reinheitsgrad der T-Zellen als prozentualer Anteil an der Probe angegeben. Pro Genotyp wurden drei Thymi zusammengefasst.) (A) zeigt die Southernblot-Analyse der Proben. Insgesamt sind bei der Isolation wenige Zellen erhalten worden, sodass für die Southern-Analyse auch nur wenig DNA eingesetzt und diese nur einmal durchgeführt werden konnte. Die Proteinproben wurden im Westernblot mit Hilfe von Antikörpern gegen Cofilin1 (KG60-Antikörper) und GAPDH auf das Cofilin1-Expressionsniveau hin untersucht. In (B) ist die graphische Auswertung der Westernblot-Analyse zusammengefasst. Die erhaltenen Banden wurden mit Hilfe des Computerprogramms Radames densitometrisch untersucht, mit GAPDH als Ladekontrolle gegeneinander verrechnet und das Ergebnis dargestellt. Die Cofilin1-Expression der Cof1<sup>fl/fl</sup>-Zellen wurde dabei auf 100 % gesetzt.

Der Southernblot zeigt für die CD4-positiven Thymozyten sowohl beim Genotyp Cof1<sup>fl/fl</sup>:dLck-Cre als auch bei Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre nur sehr schwache Deletionsbanden, dessen Intensität ähnlich der flox-Bande ist, sodass daraus geschlossen werden kann, dass keine

vollständige Deletion stattgefunden hat. Bei den CD8-Thymozyten erhält man dagegen eine del-Bande bei Cof1<sup>fl/fl</sup>:dLck-Cre- und ebenfalls bei Thymozyten des Genotyps Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre. Der letztgenannte Genotyp zeigt nur noch eine ganz schwache flox-Bande, woraus man folgern kann, dass in diesen Zellen eine deutlich stärkere Deletion vorliegt. Diese differentielle Deletionseffizienz ist für die dLck-Cre-Rekombinase bereits in der Literatur beschrieben (ZHANG et al., 2005).

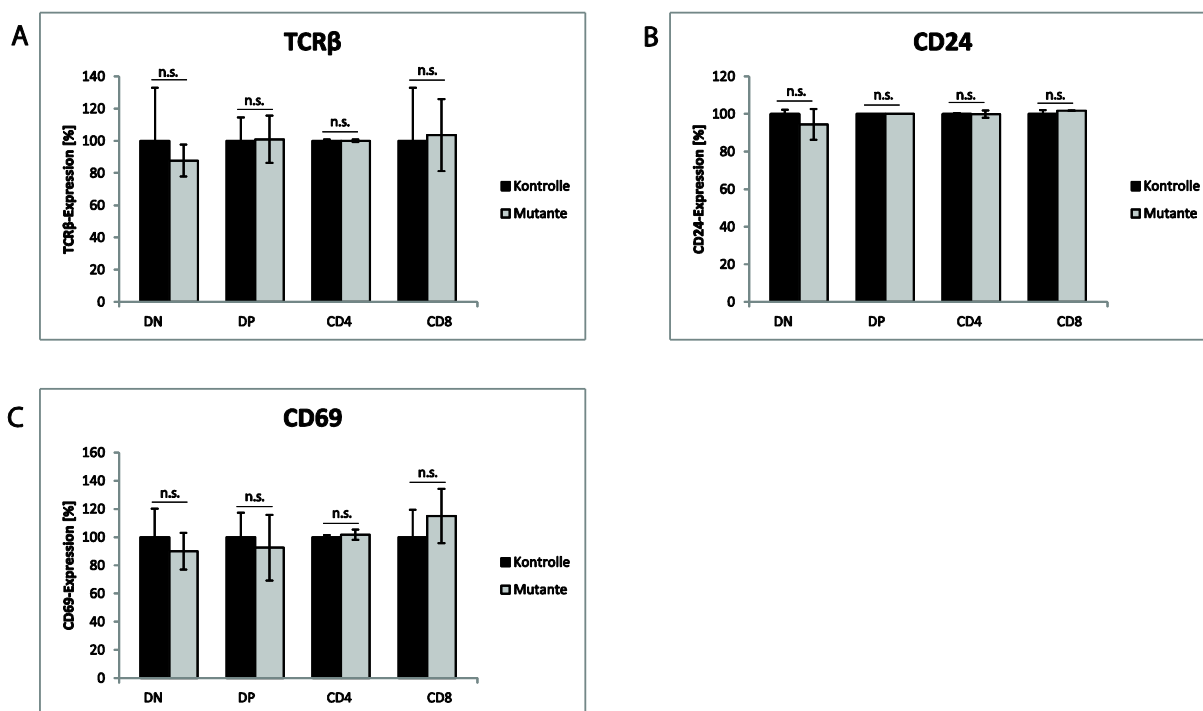
Das Ergebnis des Westernblots zeigt, dass in den einfach positiven CD4-Thymozyten bei den Cof1<sup>fl/fl</sup>:dLck-Cre-Zellen die Cofilin1-Expression sogar über der der Kontrolle liegt, während bei den Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre-Zellen die Expression leicht unter der der Kontrolle zu verzeichnen ist. Bei den einfach positiven CD8-Thymozyten liegt das Cofilin1-Expressionsniveau der Cof1<sup>fl/fl</sup>:dLck-Cre-Zellen etwa auf der Hälfte von dem der Kontrolle. Die Cofilin1-Expression der CD8 Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre-Thymozyten ist, genau wie bei den CD4-Zellen dieses Genotyps, leicht unter der der heterozygoten Kontrolle angesiedelt. Das Ergebnis zeigt, dass die Deletion auf Proteinebene im Gegensatz zur DNA-Ebene nicht sehr stark ausgeprägt ist, was sich damit begründen lässt, dass das Cofilin1-Protein in T-Zellen eine sehr große Halbwertszeit besitzt (vgl. Abschnitt 4.4), sodass erst über die Zeit das Protein verschwindet und das Expressionsniveau auch zu diesem Zeitpunkt von Zelle zu Zelle variiert.

### **4.3.3.3. Entwicklungsspezifische Marker belegen eine unbeeinträchtigte Reifung von Thymozyten mit Cofilin1-Deletion**

Während der T-Zellreifung im Thymus werden verschiedene Oberflächenmarker auf den Thymozyten hoch- bzw. herunterreguliert. Dazu zählen die  $\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors, CD24 (HSA) und CD69. Die Expression der  $\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors beginnt ab einer späten Phase des doppelt positiven Stadiums kurz vor der positiven Selektion. Von diesem Zeitpunkt an wird sie stark exprimiert (ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2004). Der Oberflächenmarker CD24 wird ab einer frühen Phase des doppelt positiven Stadiums der T-Zellentwicklung exprimiert (CRISPE, BEVAN, 1987) und wieder herunter reguliert wenn die T-Zellen den Thymus verlassen. Die CD69-Expression geht mit der positiven Selektion einher und hält dann fortwährend an (YAMASHITA et al., 1993). Die Expression aller beschriebenen Marker beginnt in etwa zur gleichen Entwicklungsphase der T-Zellreifung und zwar vor dem Schlüsselereignis der positiven Selektion. Die Aktivität der dLckCre-Rekombinase hingegen beginnt kurz nach der positiven Selektion (vgl. Abbildung 4.11), sodass die Untersuchung dieser Marker dazu genutzt werden kann, eventuelle Auswirkungen der Cofilin1-Deletion in diesen Zellen



aufzudecken, die sich in Expressionsunterschieden im Vergleich von Mutante mit Kontrolle äußern. Für die Untersuchung wurden wieder  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}:\text{dLck-Cre}$ -Tiere als Mutante und  $\text{dLck-Cre}$ -Mäuse als Kontrolle verwendet. Es wurde wieder auf Tiere mit einem bereits deletierten und einem geflochten Cofilin1-Allel zurückgegriffen, um sicherzustellen, dass nicht nur eine heterozygote Deletion erfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.21 zusammengefasst.

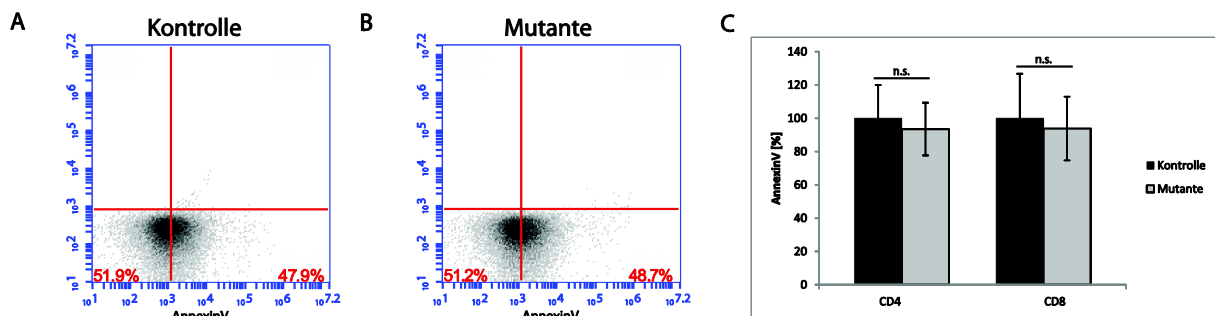


**Abbildung 4.21: Expressionsanalyse verschiedener Marker während einzelner Phasen der Reifung von Thymozyten mit Cofilin1-Deletion vermittelt durch die dLck-Cre-Rekombinase.** Thymozyten von  $\text{dLck-Cre}$ - (Kontrolle) und  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}:\text{Lck-Cre}$ -Tieren (Mutante) wurden mit Immunfluoreszenzmarkern für CD4, CD8, TCRβ, CD24 und CD69 gefärbt, mit dem Durchflusszytometer untersucht und die erhaltenen Daten statistisch ausgewertet. Dabei wurde auf die Thymozyten *gagatet*. Mit Hilfe der Marker für CD4 und CD8 konnte bei der Auswertung auf die einzelnen Phasen der T-Zellentwicklung *gagatet* und dann die Expression der drei Entwicklungsmarker bestimmt werden. Für die Auswertung wurde der Anteil der Zellen mit Fluoreszenz für die Marker TCRβ (A), CD24 (B) und CD69 (C) der Kontrolle auf 100 % und die Werte der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Signifikanz der Abweichung von Kontrolle zu Mutante wurde mittels t-Test bestimmt. (drei unabhängige Experimente, n = 6)

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass für alle drei Marker keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Mutante, insbesondere in den einfach positiven Stadien, bestehen. Somit scheint die T-Zellreifung in diesen Zellen mit einer späten Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase hinsichtlich dieses Aspekts nicht beeinflusst zu sein.

## 4.3.3.4. Thymozyten mit Cofilin1-Deletion zeigen keine erhöhte Apoptose

Während ihrer Entwicklung im Thymus durchlaufen die Thymozyten Selektionsschritte, die sicherstellen, dass nur solche T-Zellen in die Peripherie auswandern, die körpereigene MHC-Moleküle und körperfremde Antigene erkennen können. Durch diese Selektion kommt es zu einem verstärkten Vorkommen von Apoptose. Um zu überprüfen, ob ein Fehlen von Cofilin1 ab einer späten Phase der T-Zellentwicklung zu einer Erhöhung des programmierten Zelltods führt, wurde dies im Folgenden analysiert. Dazu wurden Thymozyten von  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}$ -dLck-Cre (Mutante) und dLck-Cre-Mäusen (Kontrolle) mit Hilfe der beiden Marker AnnexinV und Propidiumiodid gefärbt. AnnexinV hat als Phospholipid-Bindeprotein eine Affinität für Phosphatidylserin, welches sich bei apoptotischen Zellen auf der Membranaußenseite befindet. Propidiumiodid färbt dagegen tote und spät apoptotische Zellen an, indem es in freie DNA interkaliert und somit nur bei einer beschädigten Zellmembran die Zelle anfärbt. Mit Hilfe dieser beiden Farbstoffe können lebende (Propidiumiodid-negativ) und in Apoptose befindliche Zellen (AnnexinV-positiv) identifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.22 zusammengefasst.



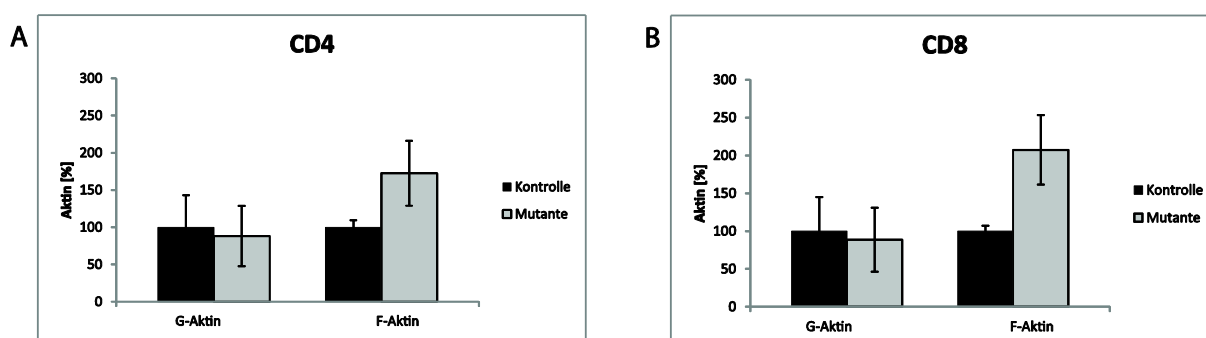
**Abbildung 4.22: Untersuchung des Apoptosestatus in Thymozyten mit dLck-Cre-Rekombinase vermittelter Cofilin1-Deletion.** Thymozyten von dLck-Cre- (Kontrolle) und  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}$ :Lck-Cre-Tieren (Mutante) wurden mit Markern für AnnexinV und Propidiumiodid sowie für CD4 und CD8 gefärbt und mit dem Durchflusszytometer untersucht. Dabei wurde zunächst auf lebende (Propidiumiodid-negativ) und apoptotische Thymozyten (AnnexinV-positiv) *gated* (A, B). Mit Hilfe der beiden Antikörper CD4 und CD8 wurde wiederum auf die einfach positiven Zellen *gated* und dann der Anteil AnnexinV-positiver Zellen bestimmt. Für die Auswertung wurde der Anteil AnnexinV-positiver Zellen der Kontrolle auf 100 % und die Werte der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt (C). Die Signifikanz der Abweichung von Kontrolle zu Mutante wurde mittels t-Test bestimmt. (drei unabhängige Experimente, n = 6)

Die Ergebnisse der Apoptosestatus-Analyse zeigen, dass der Anteil apoptotischer Zellen in der Mutante der der Kontrolle gleicht. Die statistische Analyse bestätigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der in Apoptose befindlichen Zellen bei den

beiden Genotypen besteht. Eine Deletion von Cofilin1 in einer späten Phase der T-Zellentwicklung führt nicht zu einer erhöhten Apoptose in diesen Zellen.

#### 4.3.3.5. Thymozyten mit Cofilin1-Deletion enthalten mehr F-Aktin

In Thymozyten spielt das Aktinzytoskelett nicht nur eine Rolle bei der Migration dieser Zellen, sondern auch als Gerüstbildner bei Signaltransduktionen, sodass eine Deletion von Cofilin1 und eine eventuell daraus resultierende Veränderung des G- und F-Aktinlevels Auswirkungen auf diese Zellen haben kann. Zur Analyse des Aktinstatus wurden Thymozyten von  $\text{Cofl}^{\text{fl/del}}$ :dLck-Cre-Tieren als Mutante und dLck-Cre-Mäuse als Kontrolle durch die intrazelluläre Färbung mit DNaseI (G-Aktin) sowie Phalloidin (F-Aktin) dahingehend untersucht. Mit Hilfe der Marker für CD4- bzw. CD8-positive Zellen konnte zwischen diesen Zelltypen differenziert und somit der Aktinstatus in einfach positiven Zellen untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.23 zusammengefasst.



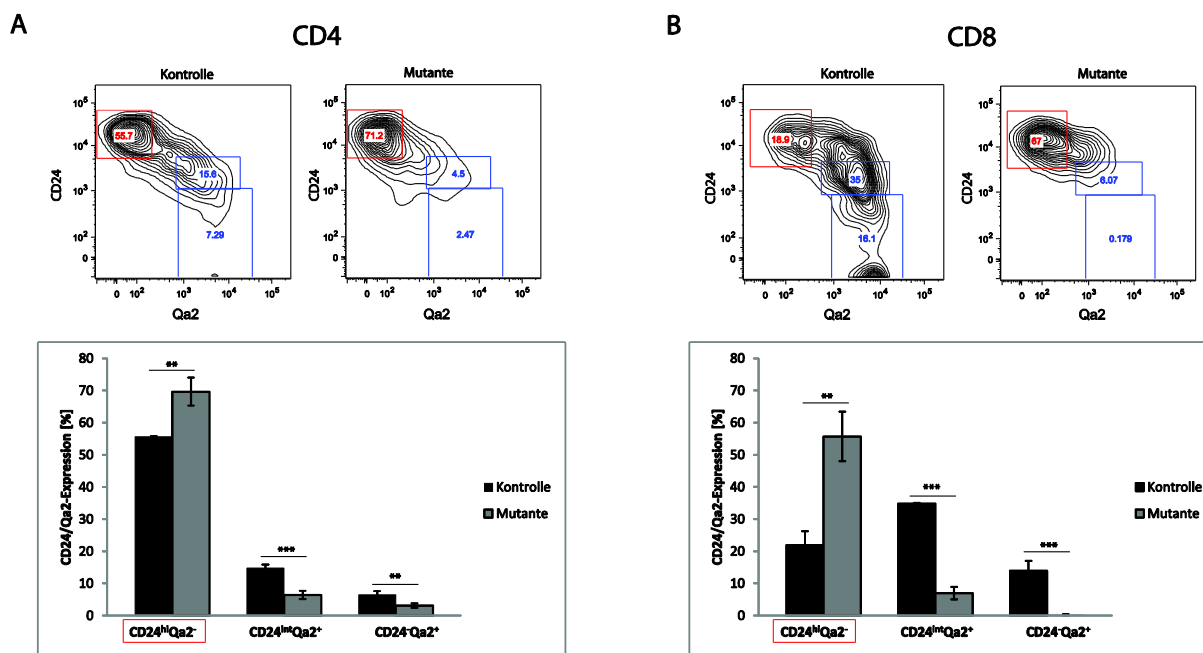
**Abbildung 4.23: Untersuchung des Aktinstatus in Thymozyten mit dLck-Cre-Rekombinase vermittelter Cofilin1-Deletion.** Thymozyten von dLck-Cre- (Kontrolle) und  $\text{Cofl}^{\text{fl/del}}$ :Lck-Cre-Tieren (Mutante) wurden mit den Markern CD4, CD8, DNaseI (G-Aktin) und Phalloidin (F-Aktin) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Mit Hilfe der beiden Antikörper CD4 und CD8 wurde auf die einfach positiven Zellen *gated* und dann der G- bzw. F-Aktinlevel in diesen Zellen analysiert. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Fluoreszenz für G- bzw. F-Aktin der Kontrolle auf 100 % und die Werte der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt. In (A) sind die Ergebnisse für CD4- und in (B) für CD8-positive Zellen dargestellt. (ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten)

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Aktinstatus-Analyse zeigt sich, dass in den CD4-positiven Mutanten-Zellen der G-Aktinlevel leicht unter dem der Kontroll-Thymozyten liegt, während der F-Aktinlevel bei der Mutante um ca. 70 % gegenüber der Kontrolle erhöht ist. In den CD8-positiven Zellen mit Cofilin1-Deletion ist die Tendenz ähnlich, allerdings ist der F-Aktinstatus bei der Mutante sogar um über 100 % erhöht. Die Zellen der Mutante weisen somit durchweg deutlich mehr F-Aktin auf.

### **4.3.3.6. Das Vorkommen von *pre-Recent Thymic Emigrants* mit Cofilin1-Deletion ist erhöht**

Erfolgreich herangereifte einfach positive T-Zellen, die sowohl die positive, als auch die negative Selektion passiert haben und bereit sind, den Thymus zu verlassen, sind an ihrem Expressionsprofil der Marker CD24 und Qa2 zu erkennen. Wie bereits in Abschnitt 4.3.3.3 beschrieben, beginnt die CD24-Expression ab einer frühen Phase des doppelt positiven Stadiums der T-Zellentwicklung. CD24 ist der Entwicklungsmarker für Thymozyten, der aber herunter reguliert wird, sobald die T-Zellen den Thymus verlassen haben. Der Marker Qa2 wird dagegen in T-Zellen, die aus dem Thymus emigrieren hochreguliert. (FINK, HENDRICKS, 2011) T-Zellen, die kurz davor sind, den Thymus zu verlassen, werden hier als *pre-Recent Thymic Emigrants* bezeichnet und sind an der starken Expression von CD24 und der niedrigen Qa2-Expression zu erkennen.

Für diese Untersuchung der Thymus-Zellen wurde zunächst mit Hilfe einer Färbung für CD4 und CD8 auf die einfach positiven Zellen *gatatet*. Innerhalb dieser Population wurden mittels des Markers für TCR $\beta$  die reifen T-Zellen (TCR $\beta^{\text{hi}}$ ) identifiziert. In diesen Zellen wurde dann die CD24- und Qa2-Expression analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.24 dargestellt.



**Abbildung 4.24:** Expression der beiden Entwicklungsmarker CD24 und Qa2 in *pre-Recent Thymic Emigrants* mit dLck-Cre-Rekombinase vermittelter Cofilin1-Deletion. Thymozyten von dLck-Cre- (Kontrolle) und Cof1<sup>fl/del</sup>:Lck-Cre-Tieren (Mutante) wurden mit den Markern CD4, CD8, TCR $\beta$ , CD24 und Qa2 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Mit Hilfe der Marker wurde zunächst auf CD4- bzw. CD8-positive Zellen *gated*, innerhalb dieser Populationen mittels des Markers TCR $\beta$  die reifen T-Zellen identifiziert und letztendlich die CD24- und Qa2-Expression der Zellen analysiert. Sowohl für CD4- (A) als auch für CD8-positive Zellen (B) sind jeweils Plots und eine statistische Auswertung dargestellt. Für die Auswertung wurde der Anteil von CD24<sup>hi</sup>Qa2<sup>-</sup>, CD24<sup>int</sup>Qa2<sup>+</sup> und CD24<sup>lo</sup>Qa2<sup>+</sup>-Zellen genommen und die Signifikanz der Abweichung von Kontrolle zu Mutante mittels t-Test bestimmt. Der rote Kasten markiert jeweils die *preRTEs* (Mutante n = 5; Kontrolle n = 2)

Die Ergebnisse zeigen sowohl für die CD4- als auch für die CD8-positiven Thymozyten, dass die Mutantenzellen mehr CD24 exprimieren, während die Qa2-Expression vermindert ist. Diese Tendenz ist bei den CD8-positiven Zellen stärker als für die CD4-positiven Zellen ausgeprägt. Die Mutante besitzt demnach mehr *pre-RTEs* (CD24<sup>hi</sup>Qa2<sup>-</sup>), aber weniger Zellen, die sich zu reifen naiven T-Zellen entwickeln als die Kontrolle. Dies könnte einen Hinweis darauf liefern, dass sich die Mutanten-Zellen zwar regulär im Thymus entwickeln, aber der finale Schritt zu reifen, naiven T-Zellen beeinträchtigt ist.

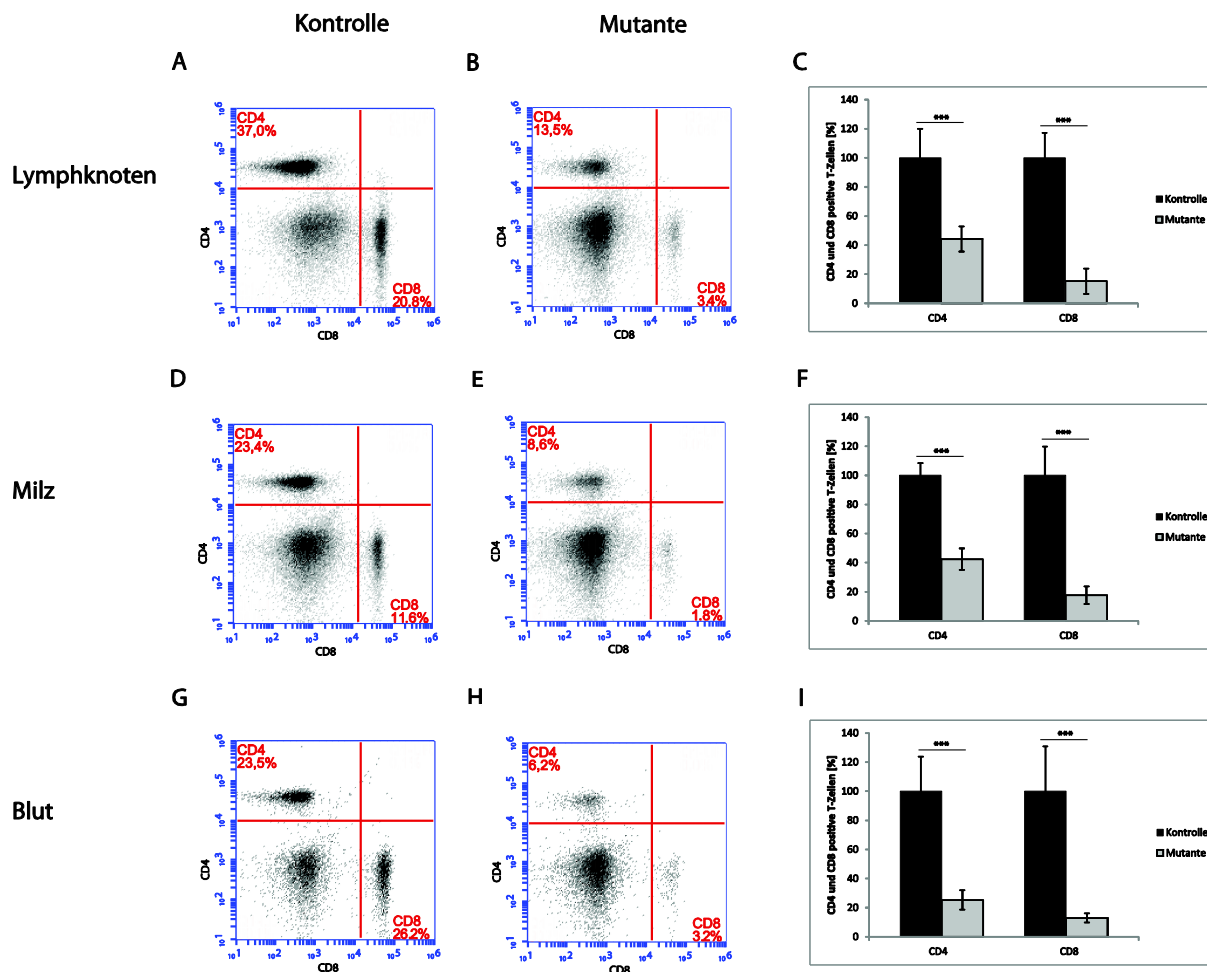
#### 4.3.4. Auswirkungen des Ausschaltens von Cofilin1 in peripheren T-Zellen

Cofilin1 spielt eine wichtige Rolle für die Entwicklung von T-Zellen im Thymus. Eine Deletion in einer frühen Reifungsphase führt zu einer Entwicklungsblockade. Wie bereits gezeigt werden konnte, hat dagegen ein Ausschalten von Cofilin1 mittels der dLck-Cre-Rekombinase in einer späteren Entwicklungsphase kurz nach der positiven Selektion keinen offensichtlichen Einfluss auf die Reifung der Thymozyten, sodass diese Zellen voraussichtlich

als reife T-Zellen in die peripheren lymphatischen Organe auswandern können. Aus *in vitro*-Studien ist weiterhin bekannt, dass Cofilin1 eine Schlüsselfunktion bei der Aktivierung von T-Zellen und der Ausbildung der immunologischen Synapse übernimmt (SAMSTAG et al., 2013). Um die Funktion von Cofilin1 in reifen T-Zellen *in vitro* besser verstehen zu können, wurden T-Zellen mit dLck-Cre-Rekombinase vermittelter Cofilin1-Deletion verschiedenen Untersuchungen unterzogen. Dazu wurden periphere T-Zellen durch die Herstellung einer Einzelzellsuspension der sekundären lymphatischen Organe Lymphknoten, Milz und Blut gewonnen.

#### **4.3.4.1. Bei einer Cofilin1-Deletion ist die Anzahl von T-Zellen in Lymphknoten, Milz und Blut verringert**

Um zu überprüfen, ob eine durch die dLck-Cre-Rekombinase vermittelte Deletion von Cofilin1 einen Einfluss auf das Einwandern von T-Helferzellen ( $CD4^+$ ) sowie von zytotoxischen T-Zellen ( $CD8^+$ ) in die peripheren lymphatischen Organe hat, wurde eine Färbung mit den Markern gegen CD4 und CD8 von T-Zellen der Mutante ( $Cof1^{fl/del}$ -dLck-Cre) im Vergleich zur Kontrolle (dLck-Cre) durchgeführt. In Abbildung 4.25 sind die FACS-Plots dieser Analyse und die dazugehörige statistische Auswertung dargestellt.



**Abbildung 4.25: Durchflusszytometrische Untersuchung von peripheren T-Zellen mit Cofilin1-Deletion mittels der dLck-Cre-Rekombinase.** Periphere T-Zellen von dLck-Cre- (Kontrolle) und Cofilin1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre-Mäusen (Mutante) aus Lymphknoten (A, B), Milz (C, D) und Blut (E, F) wurden mit Immunfluoreszenzmarkern für CD4 und CD8 gefärbt und mit dem Durchflusszytometer untersucht. Dabei wurde auf die Lymphozyten *gated*. (C, F, I) Für die statistische Auswertung wurde der Anteil CD4- bzw. CD8-positiver Zellen der Kontrolle auf 100 % und die Werte der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Signifikanz der Abweichung von Kontrolle zu Mutante wurde mittels t-Test bestimmt. (drei unabhängige Experimente, n = 6)

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass in den analysierten peripheren lymphatischen Organen bei der Mutante deutlich weniger T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) sowie zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) vorzufinden sind als bei der Kontrolle. Betrachtet man die Ergebnisse nach Zelltypen differenziert, sind in den Lymphknoten und der Milz die T-Helferzellen in der Mutante im Vergleich zur Kontrolle um etwas mehr als die Hälfte reduziert. Im Blut sind in der Mutante sogar nur noch ein Viertel der T-Helferzellen vorzufinden. Bei den zytotoxischen T-Zellen ist dieser Effekt deutlich stärker ausgeprägt. In den Lymphknoten und in der Milz ist die Zahl dieser Zellen in der Mutante etwa um den

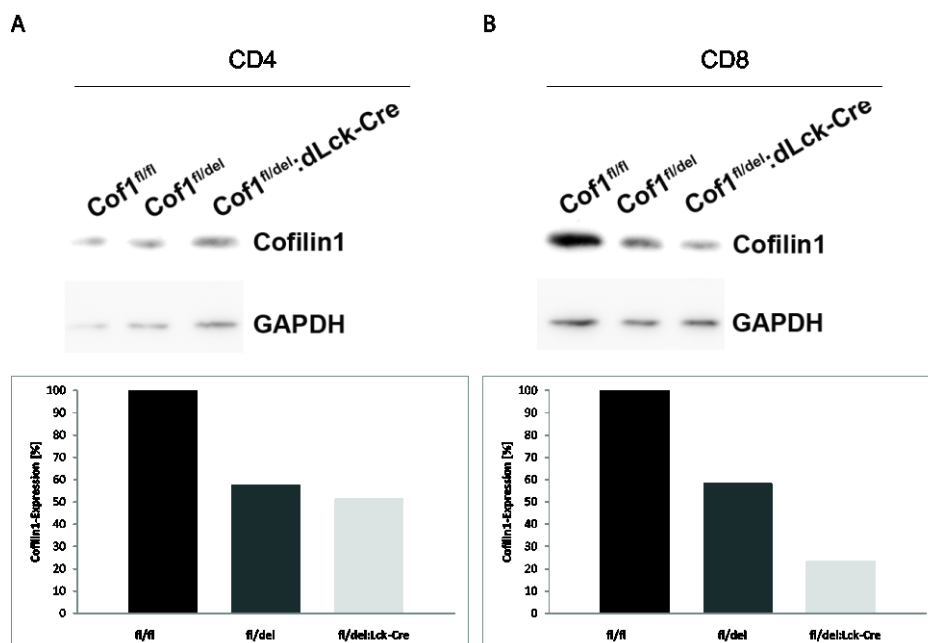
Faktor 6 reduziert. Im Blut ist die Anzahl der zytotoxischen T-Zellen um den Faktor 8 minimiert. Die Cofilin1-Deletion in einer späten Phase der T-Zellreifung führt demnach zu einem verringerten Vorhandensein von CD4- als auch CD8-positiven Zellen im peripheren lymphatischen System.

Weiterhin konnte mittels Färbung mit dem T-Zell-Marker CD3ε und dem B-Zell-Markern CD19 durch anschließende durchflusszytometrische Untersuchung gezeigt werden, dass in allen untersuchten Organen die Reduktion der T-Zellen mit einer Erhöhung der B-Zellen einher geht (Daten nicht gezeigt).

#### **4.3.4.2. Bestätigung der Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase in T-Zellen aus der Milz auf Protein-Ebene**

Um zu zeigen, dass die geringe Menge T-Zellen, die in  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}$ -dLck-Cre-Mäusen die peripheren lymphatischen Organe erreichen, definitiv eine Deletion für das Cofilin1-Protein tragen, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Dafür wurden Milz-T-Zellen mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt und anschließend *gesortet*, sodass die untersuchten Proben ausschließlich T-Helferzellen bzw. zytotoxische T-Zellen enthielten. Aufgrund der reduzierten Anzahl an T-Zellen in der Peripherie, mussten für jeden Genotyp mehrere Milzen zusammengenommen werden, sodass eine ausreichend große Zellzahl für die spätere Analyse zur Verfügung stand. Um sowohl eine Southern-, als auch eine Westernblot-Analyse durchzuführen, wurden zu wenige Zellen erhalten, sodass letztendlich ausschließlich eine Analyse auf Proteinebene erfolgte. Für die Mutante mit dem Genotyp  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}:\text{dLck-Cre}$  wurden 13 Tiere eingesetzt, für die Kontrollen  $\text{Cof1}^{\text{fl/fl}}$  und  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}$  jeweils sechs Tiere. Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse hinsichtlich des Cofilin1-Levels sind in Abbildung 4.26 zusammengefasst.





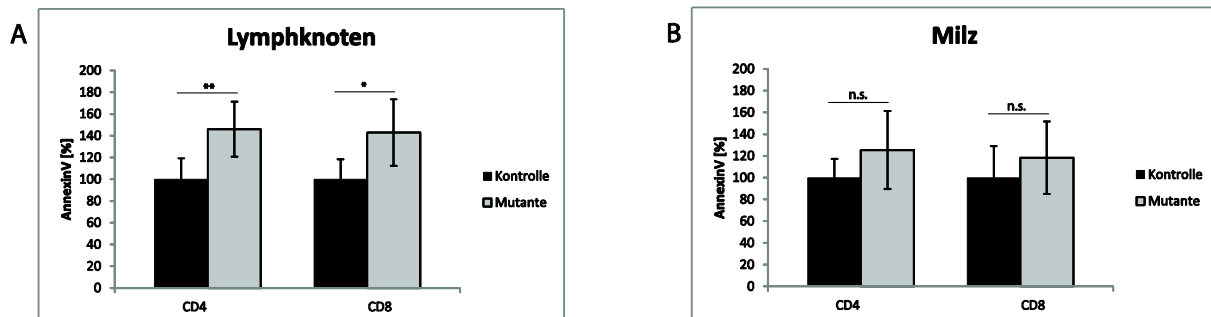
**Abbildung 4.26: Westernblot-Analyse der Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase in T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen aus der Milz.** In *gesorteten* T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen aus der Milz von  $\text{Cof1}^{\text{fl/fl}}$ -,  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}$ - und  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}};\text{dLck-Cre}$ -Mäusen wurde mittels Antikörper gegen Cofilin1 (KG60-Antikörper) und GAPDH das Cofilin1-Expressionsniveau untersucht. Sowohl für CD4-T-Zellen (A) als auch für CD8-T-Zellen (B) ist das Ergebnis des Westernblots und die graphische Auswertung zusammengefasst. Die erhaltenen Banden wurden mit Hilfe des Computerprogramms Radames densitometrisch untersucht, mit GAPDH als Ladekontrolle gegeneinander verrechnet und das Ergebnis dargestellt. Die Cofilin1-Expression der  $\text{Cof1}^{\text{fl/fl}}$ -Kontrolle wurde dabei auf 100 % gesetzt.

Die Westernblot-Analyse zeigt, dass bei beiden Zelltypen in der heterozygoten  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}$ -Kontrolle die Cofilin1-Expression im Vergleich zur  $\text{Cof1}^{\text{fl/fl}}$ -Kontrolle etwa um die Hälfte reduziert ist. In der Mutante liegt die Cofilin1-Expression in den T-Helferzellen ebenfalls auf ca. 50 %, sodass in diesen Zellen nur eine geringe Cofilin1-Deletion stattfindet. In den zytotoxischen T-Zellen dagegen wird nur noch 20 % Cofilin1 im Verhältnis zur  $\text{Cof1}^{\text{fl/fl}}$ -Kontrolle exprimiert. In diesen Zellen findet erwartungsgemäß aufgrund der differentiellen Deletionseffizienz der dLck-Cre-Rekombinase deutlich mehr Rekombination vermittelt durch die dLck-Cre-Rekombinase statt.

#### 4.3.4.3. T-Zellen mit Cofilin1-Deletion weisen ein erhöhtes Vorkommen von Apoptose auf

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Cofilin1-Expression bei der Mutante, insbesondere in den zytotoxischen T-Zellen, deutlich vermindert ist, stellt sich die Frage, wie es zu der Reduktion der peripheren T-Zellen kommen kann. Deshalb wurden diese Zellen ebenfalls einer Untersuchung hinsichtlich des Apoptosestatus, wie bereits in Abschnitt 4.3.3.5 beschrieben, unterzogen (siehe Abbildung 4.27). Überprüft wurde der Status in T-

Zellen aus Lymphknoten und Milz von  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}:\text{dLck-Cre-}$  (Mutante) und  $\text{dLck-Cre-}$ -Mäusen (Kontrolle). T-Zellen aus Blut wurden nicht analysiert, da für diesen Assay zu wenige Zellen aus einem Tier gewonnen werden konnten.



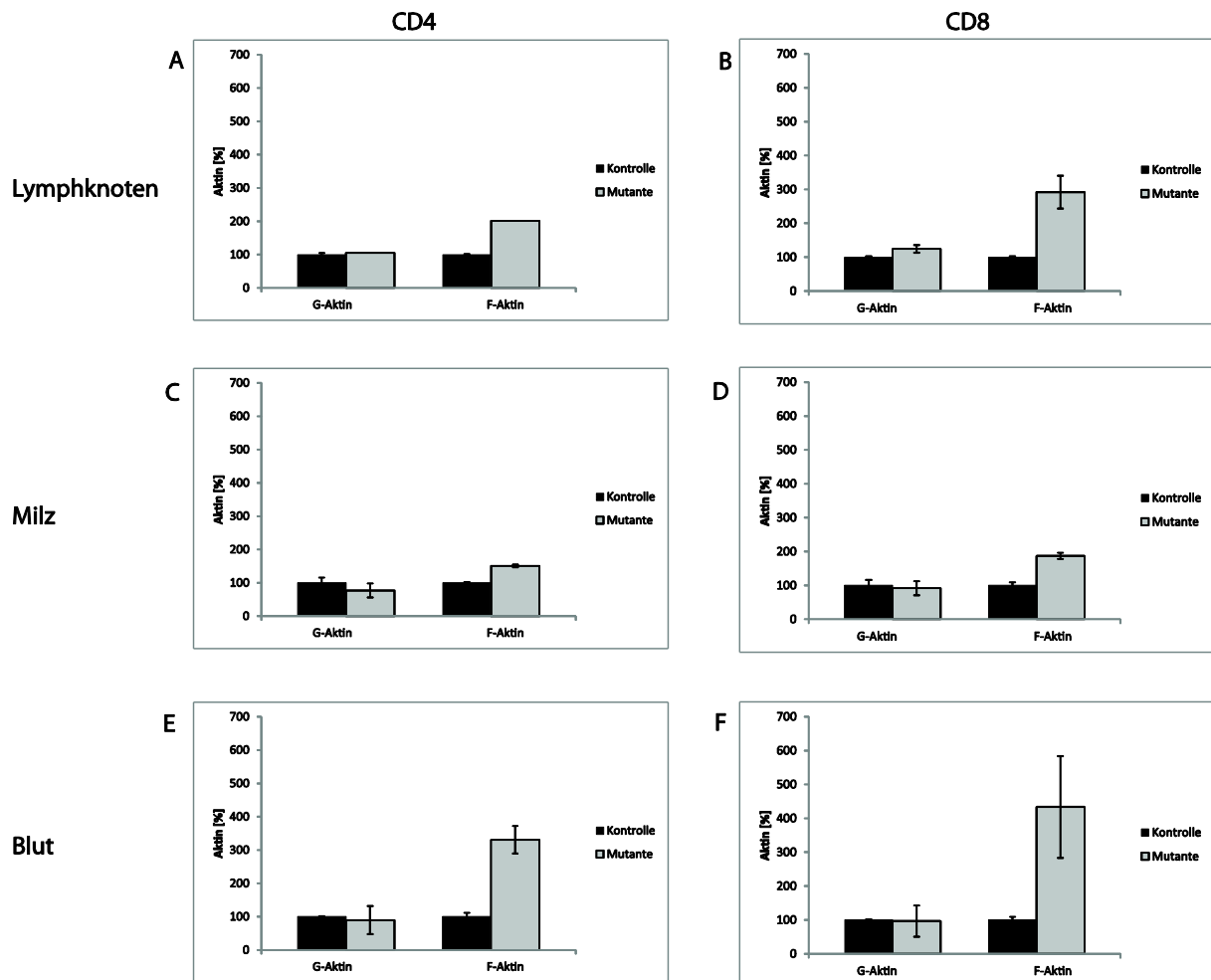
**Abbildung 4.27: Untersuchung des Apoptosestatus in T-Zellen mit dLck-Cre-Rekombinase vermittelter Cofilin1-Deletion.** T-Zellen aus Lymphknoten (A) und Milz (B) von  $\text{dLck-Cre-}$  (Kontrolle) und  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}:\text{dLck-Cre-}$  Tieren (Mutante) wurden mit Markern für AnnexinV und Propidiumiodid sowie für CD4 und CD8 gefärbt und mit dem Durchflusszytometer untersucht. Dabei wurde auf lebende (Propidiumiodid-negativ) und apoptotische Lymphozyten (AnnexinV-positiv) *gegatet*. Mit Hilfe der beiden Antikörper CD4 und CD8 wurde wiederum auf die einfach positiven Zellen *gegatet* und dann der Anteil AnnexinV-positiver Zellen bestimmt. Für die Auswertung wurde der Anteil AnnexinV-positiver Zellen der Kontrolle auf 100 % und die Werte der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Signifikanz der Abweichung von Kontrolle zu Mutante wurde mittels t-Test bestimmt. (drei unabhängige Experimente, n = 6)

Die Analyse zeigt für beide Organe eine Tendenz zu einer Erhöhung des programmierten Zelltods bei der Mutante mit Cofilin1-Deletion vermittelt durch die dLck-Cre-Rekombinase. Dies ist sowohl in den T-Helferzellen als auch in den zytotoxischen T-Zellen der Fall. In den Lymphknoten ist die Anzahl apoptotischer Zellen sogar signifikant erhöht. Für die Analyse konnten nur sehr wenige Zellen einbezogen werden, da, wie bereits in Abschnitt 4.3.4.1 gezeigt, die Anzahl der T-Helferzellen als auch der zytotoxischen T-Zellen in diesen peripheren lymphatischen Organen stark reduziert ist. Mikroskopische Betrachtungen während diverser Versuche konnten ebenfalls eine verminderte Vitalität, z.B. gezeigt mit dem Viabilitätsfarbstoff Trypanblau, dieser Zellen bestätigen. Ein Fehlen von Cofilin1 in T-Zellen führt somit zu einer erhöhten Apoptose in den untersuchten Zellen.

#### 4.3.4.4. In T-Zellen mit Cofilin1-Deletion ist der F-Aktinlevel deutlich erhöht

Im Folgenden wurde der Aktinstatus der Cofilin1-defizienten T-Zellen untersucht. In T-Zellen spielt das Aktinzytoskelett nicht nur eine wichtige Rolle bei der Migration dieser Zellen, um zur entsprechenden Antigen präsentierenden Zelle zu gelangen. Es hat auch als gerüstbildendes Protein eine bedeutende Funktion bei der Aktivierung dieser Zellen und bei

Ausbildung der immunologischen Synapse, wobei es unter anderem an Formveränderungen der Zelle beteiligt ist und auch als Transportstrecke für diverse, an der Signalvermittlung beteiligter Komponenten dient. Durch das Fehlen des Aktin depolymerisierenden Faktors Cofilin1 kann der G- bzw. F-Aktin Gehalt verändert und somit die Funktion der Zellen beeinträchtigt sein, was ebenfalls eine Erklärung für das Fehlen der T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen liefern könnte. Mit Hilfe einer intrazellulären Färbung für DNaseI (G-Aktin) und Phalloidin (F-Aktin) wurde der Aktinstatus in T-Zellen aus Mutante ( $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}:\text{dLck-Cre}$ ) und Kontrolle ( $\text{dLck-Cre}$ ) analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.28 dargestellt.



**Abbildung 4.28: Untersuchung des Aktinstatus in peripheren T-Zellen mit Cofilin1-Deletion vermittelt durch die dLck-Cre-Rekombinase.** T-Zellen von dLck-Cre- (Kontrolle) und  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}$ :Lck-Cre-Tieren (Mutante) wurden mit den Markern CD4, CD8, DNaseI (G-Aktin) und Phalloidin (F-Aktin) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Mit Hilfe der beiden Antikörper CD4 und CD8 wurde auf T-Helferzellen bzw. zytotoxische T-Zellen *gated* und dann der G- bzw. F-Aktinlevel in diesen Zellen analysiert. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Fluoreszenz für G- bzw. F-Aktin der Kontrolle auf 100 % und die Werte der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt. In (A, C, E) sind die Ergebnisse für die T-Helferzellen und in (B, D, F) für die zytotoxischen T-Zellen der einzelnen Organe dargestellt. (ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten)

Die Auswertung der Aktinstatus-Analyse zeigt, dass die F-Aktinlevel der Mutante in allen Organen deutlich erhöht sind. Dies ist in den zytotoxischen T-Zellen stärker zu verzeichnen als in den T-Helferzellen, was darauf zurückzuführen ist, dass in diesen Zellen die Cofilin1-Deletion mittels der dLck-Cre-Rekombinase effizienter erfolgt. Tendenziell ist dieser Anstieg sowohl für  $\text{CD4}^+$ - als auch für  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen im Blut am stärksten und in der Milz am mildesten ausgeprägt. Der G-Aktin Gehalt scheint im Gegensatz zu den untersuchten Zellen aller Gewebe kaum verändert zu sein. Durch das Fehlen von Cofilin1 kommt es somit zu einem erhöhten F-Aktin Gehalt in T-Zellen.

#### **4.3.5. Zytotoxische T-Zellen mit Cofilin1-Deletion sind bezüglich ihrer Aktivierbarkeit verändert**

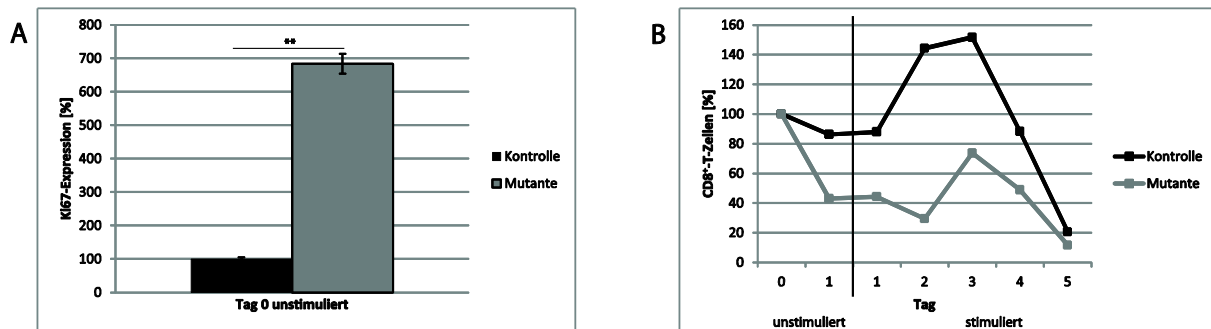
Wie die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, erfolgt in den zytotoxischen T-Zellen eine stärkere Deletion des Cofilin1-Proteins als in den T-Helferzellen. Aus diesem Grund wurden diese Zellen nun in Bezug auf ihre Aktivierbarkeit detailliert analysiert.

Dazu wurden mit Hilfe der MACS-Zellseparation CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) aus der Milz von Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre-Tieren als Mutante und Lck-Cre-Mäusen als Kontrolle gewonnen. Dabei wurde nach dem Prinzip der positiven Selektion gearbeitet, sodass die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit magnetischen Antikörpern markiert, an die MACS-Säule binden gelassen und letztendlich eluiert wurden. Um für diese Experimente ausreichend große Zellzahlen zu erhalten, mussten die Zellen von Milzen mehrerer Tiere vereinigt werden. Bei der Mutante wurden fünf Tiere zusammengefasst, bei der Kontrolle zwei. Für die verschiedenen Analysen wurden die Zellen in Kultur genommen und permanent die beiden Rezeptoren CD3 und CD28 stimuliert. Eine Stimulation dieser Rezeptoren führt zur Aktivierung naiver T-Zellen (FRAUWIRTH, THOMPSON, 2002). CD3 ist eine Komponente des T-Zellrezeptorkomplexes, während CD28 einen Co-Rezeptor dieses darstellt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen kultiviert, im Abstand von 24 h jeweils eine Probe (Triplikate) genommen und hinsichtlich Proliferation, Expression diverser Aktivierungsmarker, und Sekretion eines T-Zell-Wachstumsfaktors untersucht. Zum Vergleich wurden Zellen direkt nach der Präparation (Tag 0 unstimuliert) und unstimulierte Zellen nach einem Tag in Kultur (Tag 1 unstimuliert) analysiert. Bei allen Analysen wurde mit Hilfe einer Lebend-Tot-Färbung auf die lebenden Zellen *gagatet* und innerhalb dieser, mittels des Markers für CD8, die zytotoxischen T-Zellen identifiziert.

##### **4.3.5.1. Zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion sind nach Aktivierung bei der Proliferation beeinträchtigt**

Bei der Aktivierung von T-Zellen wird unter anderem die Proliferation der Zellen angeregt, sodass es zur Zellteilung und somit zur klonalen Expansion kommt. Um zu prüfen, ob das Ausschalten von Cofilin1 in zytotoxischen T-Zellen einen Einfluss auf die Proliferation hat, wurde zum Zeitpunkt 0 die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 detektiert. Dieses Protein wird während des Zellzyklus in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert, nicht aber in ruhenden Zellen (SCHOLZEN, GERDES, 2000). Weiterhin wurde zu

jedem Zeitpunkt mit Hilfe von *Counting Beads* die Zellzahl bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.29 zusammengefasst.



**Abbildung 4.29: Proliferationsanalyse von zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase.** (A) Nach der Isolation der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Tag 0 unstimuliert) von Mutante (Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre) und Kontrolle (dLck-Cre) wurde über eine intrazelluläre Färbung mit dem Marker Ki-67 die Proliferation durchflusszytometrisch untersucht. Für die statistische Auswertung wurde der Mittelwert des Anteils der Ki67-Expression der Kontrolle auf 100 % und der Wert der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Signifikanz der Abweichung von Kontrolle zu Mutante wurde mittels t-Test bestimmt. (ein Experiment) (B) Über den gesamten Versuchszeitraum von fünf Tagen hinweg wurden die Zellen in Kultur gehalten und die Rezeptoren CD3 und CD28 stimuliert. Zu jedem Zeitpunkt (24 h-Intervall) wurde die Zellzahl bestimmt. Für die Auswertung wurden die erhaltenen Werte normalisiert, da aufgrund der erhöhten Apoptose der Mutantenzellen schon zu Beginn eine Variation bezüglich der Zellzahl bestand. Bei der Normalisierung wurde jeweils die Zellzahl zum Zeitpunkt „0“ auf 100 % und die folgenden Werte entsprechend ins Verhältnis gesetzt. (ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten)

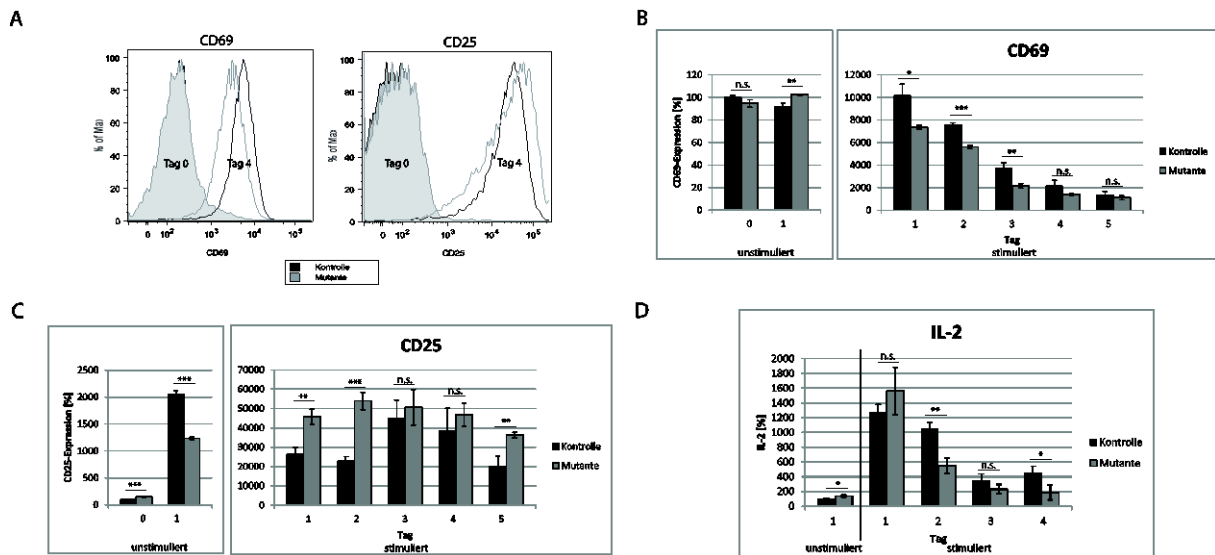
Die Ergebnisse zeigen, dass die zytotoxischen T-Zellen der Mutante (Cof1<sup>fl/del</sup>:Lck-Cre) zu Beginn des Versuchs deutlich mehr Ki-67 exprimieren als die Kontrollzellen (dLck-Cre). Die Mutante weist also deutlich mehr Zellen auf, die sich gerade in der Mitose befinden. Betrachtet man wiederum die Überprüfung der Zellzahl, wird deutlich, dass die Kontrolle über die Zeit hinweg proliferiert, während dies in der Mutante kaum der Fall ist. Die Kontrolle expandiert bis zum Tag drei um den Faktor 1,5 und dann geht die Zellzahl erwartungsgemäß zurück. Die Mutante zeigt dagegen kein merkliches Expansionsverhalten und liegt mit ihrer Zellzahl durchschnittlich um den Faktor 3 unter der der Kontrolle.

Eine Deletion von Cofilin1 führt in naiven zytotoxischen T-Zellen zu einer deutlich erhöhten Proliferation im Vergleich zur Kontrolle. Nach Aktivierung der Zellen expandieren die Mutanten-Zellen in Kultur wiederum signifikant weniger.

#### **4.3.5.2. Die Expression früher Aktivierungsmarker in zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion ist verändert**

Die beiden Oberflächenmarker CD69 und CD25 sind frühe Aktivierungsmarker von T-Zellen, die kurz nach der Bindung eines Antigens an den T-Zellrezeptorkomplex exprimiert werden (SHIPKOVA, WIELAND, 2012). Naive T-Zellen exprimieren diese Marker auf niedrigem Niveau. Nach Aktivierung nimmt ihre Expression stark zu und wird über die Zeit wieder reduziert. CD69 ist ein C-Typ-Lektin. CD25 bildet die  $\alpha$ -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors, welche erst nach T-Zellaktivierung die beiden anderen konstitutiv exprimierten Untereinheiten,  $\beta$  und  $\gamma$ , komplettiert. Der Interleukin-2-Rezeptor, dessen Antigen der Wachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2) darstellt, löst eine Signalkaskade aus, die unter anderem im Zuge einer positiven Rückkopplung zur verstärkten Ausschüttung von IL-2 (SMITH, 1988) und zur klonalen Expansion der T-Zellen führt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Expressionsanalyse der Marker CD69 und CD25 zu den einzelnen Zeitpunkten dargestellt. Weiterhin wurde neben dieser Analyse der Mediumüberstand der Zellen mit Hilfe eines ELISAs auf das Vorhandensein von IL-2 überprüft (siehe Abbildung 4.30).



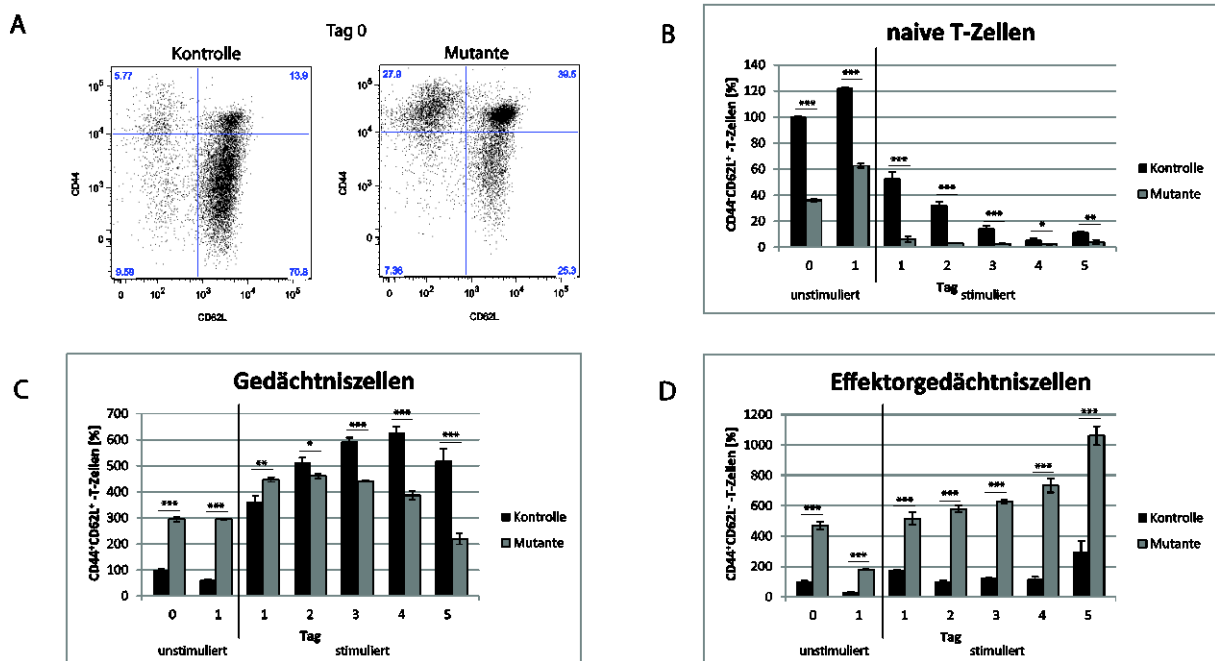
**Abbildung 4.30: Expression früher Aktivierungsmarker in zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase.** Über den gesamten Versuchszeitraum von fünf Tagen hinweg wurden die Zellen in Kultur gehalten und die Rezeptoren CD3 und CD28 stimuliert. Zu jedem Zeitpunkt (24 h-Intervall) wurden die Zellen mit den Markern für CD69 und CD25 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Histogramme zeigen repräsentativ die Ergebnisse für Tag vier im Vergleich zu den Zellen direkt nach der Isolation (**A**). Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Fluoreszenz der Zellen für die Marker CD69 (**B**) und CD25 (**C**) der Kontrolle auf 100 % und die Werte der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt. (**D**) Mit Hilfe eines ELISAs wurde ebenfalls zu jedem Zeitpunkt die IL-2-Sekretion ins Medium überprüft. Für die Analyse wurden wieder die Werte der Kontrolle auf 100 % und die der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Signifikanz der Abweichung von Kontrolle zu Mutante wurde mittels t-Test bestimmt. (ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten)

Die Expressionsanalyse zeigt, dass sich die Mutante (Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre) bezüglich dieser beiden frühen Aktivierungsmarker gegenläufig zur Kontrolle (dLck-Cre) verhält. Die zytotoxischen Cofilin1-KO-T-Zellen exprimieren über die gesamte Zeitspanne weniger CD69, aber mehr CD25 als die Kontrolle. Weiterhin exprimieren die Zellen der Mutante zu Beginn mehr IL-2 als die Kontrollzellen. Dieses Verhältnis kehrt sich ab Tag zwei um. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Cofilin1-Deletion in zytotoxischen T-Zellen dazu führt, dass diese Zellen im Gegensatz zu naiven T-Zellen schon von vorne herein aktiviert sind und daher bestimmte Aktivierungsmarker, wie CD25, stärker exprimieren. Andere Marker, die einen Hinweis auf Aktivierung von T-Zellen liefern, wie CD69, sowie die Ausschüttung des Wachstumsfaktors IL-2 werden dagegen aufgrund der permanenten Aktivierung nicht hochreguliert.



#### 4.3.5.3. Eine Cofilin1-Deletion führt zu einem verminderten Vorhandensein von naiven zytotoxischen T-Zellen

Zur gezielteren Untersuchung des Aktivierungsstatus der Cofilin1-deletierten zytotoxischen T-Zellen aus Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre-Mäusen wurden zwei weitere Marker untersucht. CD62L und CD44 sind Zelladhäsionsmoleküle, die ebenfalls Aufschluss über den Aktivierungszustand von T-Zellen geben. Sie werden beide auch als *Homing*-Rezeptoren bezeichnet (BUTCHER, PICKER, 1996). Die Expression von CD62L sorgt dafür, dass T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen verbleiben und muss folglich bei T-Zellaktivierung entfernt werden, damit die Zellen in das Gewebe einwandern können. Die CD44-Expression ermöglicht dagegen den T-Zellen ein Einwandern ins Gewebe. Eine naive T-Zelle ist durch eine starke Expression von CD62L und eine minimale CD44-Expression gekennzeichnet (CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>). Zentrale Gedächtniszellen (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) und Effektorgedächtniszellen (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>), die nach Aktivierung naiver T-Zellen gebildet werden, exprimieren dagegen CD44. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 4.31 dargestellt.



**Abbildung 4.31: Expression der Marker CD62L und CD44 in zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion mittels dLck-Cre-Rekombinase.** Über den gesamten Versuchszeitraum von fünf Tagen hinweg wurden die Zellen in Kultur gehalten und die Rezeptoren CD3 und CD28 stimuliert. Zu jedem Zeitpunkt (24 h-Intervall) wurden die Zellen mit den Markern für CD62L und CD44 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die FACS-Plots zeigen die Kontroll- und Mutantenzellen am Tag 0 direkt nach der Isolation im Vergleich (A). Für die Auswertung wurde jeweils der Anteil der Fluoreszenz der CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> (B), der CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (C) und der CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>-Zellen (D) der Kontrolle auf 100 % und die Werte der Mutante dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Signifikanz der Abweichung von Kontrolle zu Mutante wurde mittels t-Test bestimmt. (ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten)

Die Untersuchung zeigt, dass die Kontrolle (dLck-Cre) zu Beginn sehr viele naive T-Zellen aufweist, während dies bei der Mutante (Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre) nicht der Fall ist. Über die Zeit hinweg nimmt die Anzahl dieser Zellen bei der Kontrolle deutlich ab, da die T-Zellen durch die CD3- und CD28-Stimulation aktiviert werden. Diese Abnahme ist auch bei der Mutante zu verzeichnen. Dagegen besitzt die Mutante von Beginn an mehr zentrale Gedächtniszellen und Effektorgedächtniszellen als die Kontrolle. Bei den zentralen Gedächtniszellen kehrt sich diese Beziehung an Tag zwei um, sodass ab diesem Tag die Kontrolle mehr dieser Zellen besitzt als die Mutante. Bei den Effektorgedächtniszellen weist die Mutante dauerhaft deutlich mehr dieser Zellen auf. Ein Fehlen von Cofilin1 in zytotoxischen T-Zellen führt anscheinend dazu, dass die Anzahl von zentralen Gedächtnis- und Effektorgedächtniszellen erhöht ist, während kaum naive zytotoxische T-Zellen vorliegen. Durch das Fehlen von Cofilin1 kommt es offensichtlich zu einer sehr frühen Aktivierung dieser Zellen.

#### 4.4. Cofilin1-Deletion in peripheren T-Zellen *in vitro*

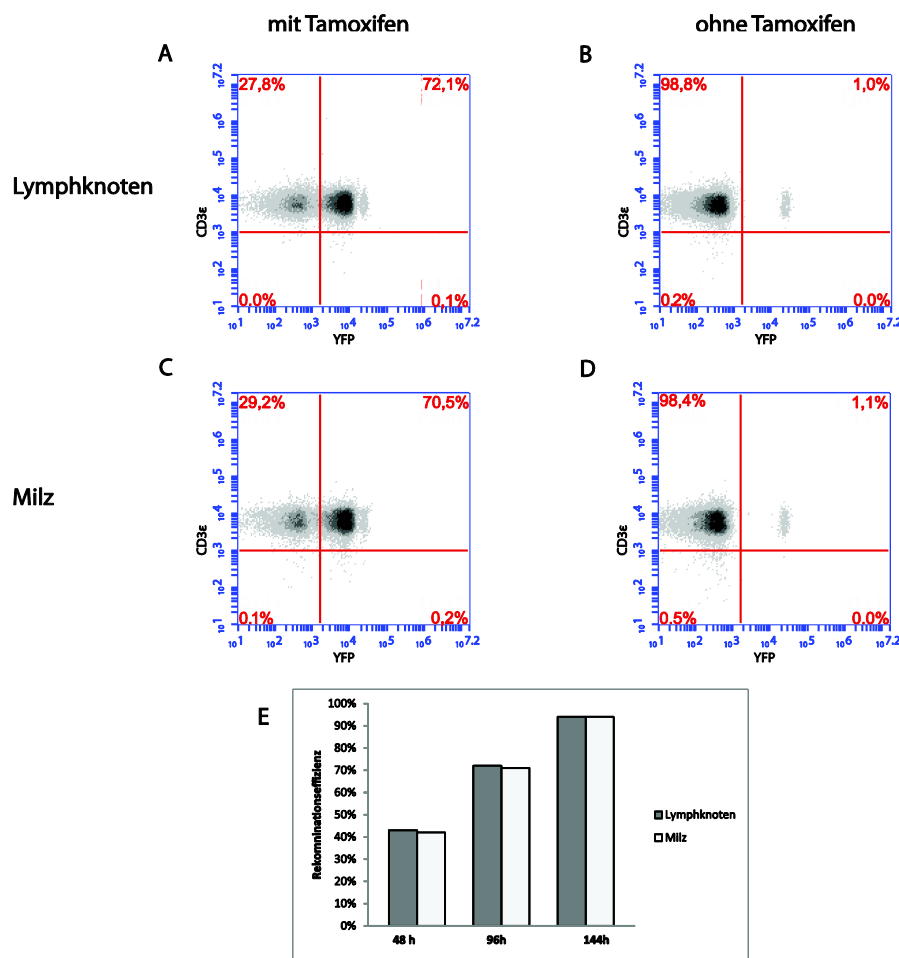
Wie die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, geht eine Cofilin1-Deletion in einer späten Phase der T-Zellentwicklung *in vivo* mit einer Reduktion der T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen einher. Um mehr Cofilin1-KO-T-Zellen für weiterführende Analysen zu erhalten, wurde die Deletion *in vitro* herbeigeführt. Für diese Studien wurde mit der CreER<sup>T2</sup>-Rekombinase gearbeitet. Dies ist eine induzierbare Cre-Rekombinase, die fusioniert mit einer mutierten Liganden-Bindedomäne des Estrogenrezeptors exprimiert wird. Der Estrogenrezeptor ist ein nuklearer Rezeptor, der in seinem inaktiven Zustand im Zytoplasma vorliegt. Durch Ligandenbindung in Form des Estrogenrezeptor-Modulators Tamoxifen gelangt das CreER<sup>T2</sup>-Fusionsprotein in den Zellkern und kann dort die Rekombination katalysieren. Die CreER<sup>T2</sup>-Rekombinase wird in der verwendeten Mauslinie unter dem ROSA26-Promotor ubiquitär exprimiert.

##### 4.4.1. Etablierung der Bedingungen zur Tamoxifen-induzierbaren CreER<sup>T2</sup>-Rekombinase in T-Zellen mit Hilfe der Rosy-Reportermaus

Für diese Vorversuche wurden CreER<sup>T2</sup>-Mäuse mit der Rosy-Reportermauslinie gekreuzt, um Mäuse des Genotyps Rosy:CreER<sup>T2</sup> zu erhalten. In den Rosy-Reportermäusen liegt stromabwärts des ROSA26-Promotors eine von loxP-Stellen flankierte Stopp-Kassette gefolgt von der kodierenden Region des eYFP-Reportergens. Durch eine Cre-vermittelte Rekombination kommt es zur Deletion der Stopp-Kassette und somit zur Expression des eYFP-Gens (SRINIVAS et al., 2001). Dieses Gen wird dann in allen Zellen exprimiert, in denen die CreER<sup>T2</sup>-Rekombinase aktiv war. Eine erfolgreiche Rekombination kann wiederum anhand der Fluoreszenz des YFP-Proteins mit Hilfe des Durchflusszytometers nachgewiesen werden.

Im Vorfeld wurde einerseits die optimale Tamoxifenkonzentration ermittelt werden, die für die Aktivierung der CreER<sup>T2</sup>-Rekombinase in T-Zellen notwendig ist, gleichzeitig den Zellen aber keinen Schaden zufügt. Die Etablierungsversuche haben gezeigt, dass kein Unterschied zwischen dem Einsatz von 1 µM und 5 µM Tamoxifen besteht (Daten nicht gezeigt), weshalb für die folgenden Experimente die niedrigere Konzentration gewählt wurde. Andererseits musste der Zeitraum, der bis zu einer erfolgreichen Rekombination notwendig ist, bestimmt werden.

Für die Versuche wurden Einzelzellsuspensionen aus den peripheren lymphatischen Organen, Lymphknoten und Milz, gewonnen und durch MACS-Zellseparation mit Hilfe des panT-Kits über Depletion die T-Zellen isoliert. Der Erfolg der MACS-Zellseparation wurde über eine extrazelluläre Färbung mit dem FACS-Antikörper CD3 $\epsilon$  und anschließende durchflusszytometrische Untersuchung überprüft. Die Zellseparation ist essentiell, da die Rekombination nicht auf T-Zellen beschränkt ist, sondern auch z.B. in B-Zellen erfolgt (Daten nicht gezeigt). Die erhaltenen Zellen wurden dann in Tamoxifen-haltiges Medium in Kultur genommen und nach zwei, vier und sechs Tagen unter Verwendung des T-Zellmarkers CD3 $\epsilon$  durchflusszytometrisch untersucht (siehe Abbildung 4.32).



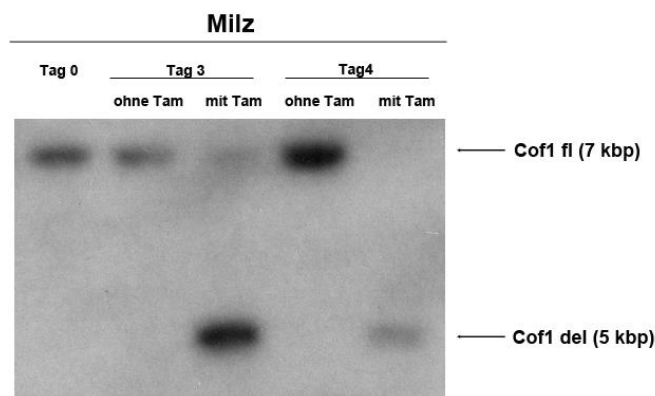
**Abbildung 4.32: Etablierung der Bedingungen zur Tamoxifen-Induktion der CRER<sup>T2</sup>-Rekombinase in T-Zellen.** Im oberen Teil der Abbildung sind FACS-Plots der Durchflusszytometeranalyse zusammengestellt, wobei CD3ε als T-Zellmarker verwendet wurde. Sowohl für T-Zellen aus Lymphknoten als auch aus Milz wurde untersucht, wie viele T-Zellen exemplarisch nach vier Tagen Tamoxifen-Behandlung (1 μM) gleichzeitig auch den Reporter YFP als Indiz für eine erfolgte Rekombination exprimieren (A, C). Als Kontrolle wurden Zellen ohne Tamoxifengabe analysiert (B, D). Es wurde auf die Lymphozyten *gegatet*. (Reinheitsgrad der T-Zellen als prozentualer Anteil an der Probe nach der Isolation → Lymphknoten: 95 %, Milz: 85 %). Weiterhin wurde die Rekombinationseffizienz in T-Zellen für die untersuchten Zeitpunkte (48 h, 96 h, 144 h) berechnet und graphisch dargestellt (E). (ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten)

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei T-Zellen aus Lymphknoten als auch aus Milz schon nach 48 h über 40 % YFP-positive Zellen vorzufinden sind. Nach 144 h sind nahezu alle T-Zellen positiv für diesen Marker. Die Kontrollen zeigen, dass auch ohne Tamoxifen-Behandlung ein kleiner Anteil von ca. 1 % der T-Zellen eine grüne YFP-Fluoreszenz zeigt. Das Signal dieser Zellen ist aber deutlich stärker als das der rekombinierten, YFP-positiven Zellen. Die Kultivierung von T-Zellen aus Lymphknoten und auch aus Milz mit 1 μM Tamoxifen im Medium führt nach sechs Tagen zu einer YFP-Reporterproteinexpression in nahezu jeder Zelle. Dies lässt auf eine erfolgreiche Rekombination unter diesen Bedingungen schließen.

Weiterhin ist anzumerken, dass über den Versuchszeitraum hinweg auch sehr viele Zellen sterben, weshalb in allen folgenden Versuchen die toten Zellen mittels MACS-Separation eliminiert wurden.

### **4.4.2. Die Tamoxifen-Induktion der Cofilin1-Deletion in peripheren T-Zellen *in vitro* führt zur Rekombination auf DNA-Ebene**

Nachdem nun mit Hilfe der Rosy-Reportermäuse die optimalen Bedingungen für eine Tamoxifen-induzierbare Rekombination mittels der CreER<sup>T2</sup>-Rekombinase in T-Zellen ermittelt wurde, sollte dies nun auf den Cofilin1-Genlocus übertragen werden. Für die Analyse der Cofilin1-Deletion in peripheren T-Zellen *in vitro* wurden Tiere des Genotyps Cof1<sup>fl/fl</sup>:CreER<sup>T2</sup> verwendet. Um für alle Analysen ausreichend viele Zellen zu erhalten, wurden die Organe aus vier Mäusen zusammengefasst. Aus Lymphknoten und Milz wurden Einzelzellen gewonnen, die T-Zellen über Depletion mit Hilfe einer MACS-Zellseparation isoliert (panT-Kit) und diese dann unter Tamoxifen-Behandlung in Kultur genommen. Nach drei bzw. vier Tagen wurden die Zellen aus der Kultur einer weiteren MACS-Separation zur Eliminierung toter Zellen unterzogen. Aus den so aufbereiteten Zellen wurde DNA gewonnen und diese in eine Southernblot-Analyse eingesetzt, um die Rekombination auf DNA-Ebene zu überprüfen. Für die Southernblot-Analyse wurde ein Restriktionsverdau mit *EcoRI* durchgeführt und eine Sonde verwendet, die zwischen dem Cofilin1-fl- und dem Cofilin1-del-Allel unterscheiden kann (vgl. Abbildung 4.33).



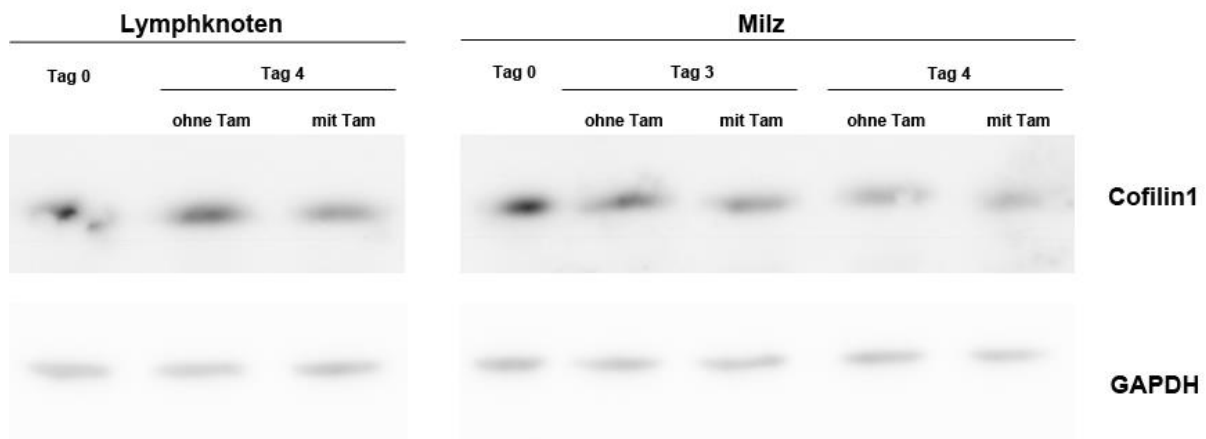
**Abbildung 4.33: Southernblot-Analyse der Tamoxifen-induzierbaren Cofilin1-Deletion in T-Zellen *in vitro*.** T-Zellen aus Milz von  $\text{Cof1}^{\text{fl/fl}};\text{CreER}^{\text{T2}}$ -Mäusen wurden in Tamoxifen-haltiges Medium (mit Tam) in Kultur genommen und nach drei bzw. vier Tagen DNA aus diesen Zellen gewonnen, um die Rekombination des Cofilin1-Gens mittels Southernblot-Analyse untersuchen zu können. Als Kontrolle wurden Zellen unter den gleichen Bedingungen ohne Tamoxifen-Behandlung (ohne Tam) analysiert. (Reinheitsgrad der T-Zellen als prozentualer Anteil an der Probe → Tag 0: 97 %; Tag 3 ohne Tamoxifen: 93 %, Tag 3 mit Tamoxifen: 91 %; Tag 4 ohne Tamoxifen: 96 %, Tag 4 mit Tamoxifen: 96 %)

Die Analyse zeigt nach drei und auch nach vier Tagen eine deutliche Deletionsbande durch Tamoxifen-Behandlung. Die Kontrollzellen, welche ohne Tamoxifen im Medium kultiviert wurden, zeigen nur eine flox-Bande. Durch die Induktion der Deletion mit Tamoxifen verschwindet diese flox-Bande fast vollständig, was an Tag vier am deutlichsten zu erkennen ist. Auch in T-Zellen aus Lymphknoten konnte nach viertägiger Tamoxifen-Behandlung in Kultur eine Deletion des Cofilin1-Gens auf DNA-Ebene nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin sei hier angemerkt, dass die ektopische Aktivität der  $\text{CreER}^{\text{T2}}$ -Rekombinase ebenfalls durch Southernblot-Analyse ausgeschlossen wurde.

Eine erfolgreiche Rekombination im Cofilin1-Genlocus mittels der  $\text{CreER}^{\text{T2}}$ -Rekombinase exprimiert unter dem ROSA26-Promotor in T-Zellen konnte somit gezeigt werden.

#### 4.4.3. Trotz Tamoxifen-induzierbarer Cofilin1-Deletion in peripheren T-Zellen ist noch Cofilin1-Protein vorhanden

Nachdem auf DNA-Ebene eine Cofilin1-Deletion mittels der Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase gezeigt werden konnte, wurde des Weiteren die Expression des Cofilin1-Proteins untersucht. Neben der Southernblot-Analyse wurde weiterhin eine Westernblot-Analyse mit Zellen derselben Kultur durchgeführt und mit Antikörpern gegen Cofilin1 und GAPDH geprobt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.34 dargestellt.



**Abbildung 4.34: Westernblot-Analyse der Tamoxifen-induzierbaren Cofilin1-Deletion in T-Zellen *in vitro*.** Proteinproben der Zellen derselben Kultur, die bereits für die Southernblot-Analyse eingesetzt wurden, wurden im Westernblot mit Hilfe von Antikörpern gegen Cofilin1 (KG60-Antikörper) und GAPDH auf das Cofilin1-Expressionsniveau hin untersucht.

Die Ergebnisse der Westernblot-Analyse zeigen, dass alle untersuchten Zellen das Cofilin1-Protein exprimieren. Eine deutliche Reduktion der Expression ist in den Proben mit Tamoxifen-Behandlung nicht zu verzeichnen. Dies führt zu der Vermutung, dass das Cofilin1-Protein eine sehr lange Halbwertszeit besitzt, sodass trotz erfolgreicher Rekombination auf DNA-Ebene, das Protein noch vorhanden ist.

### 4.5. Selektion eines RNA-Aptamers gegen Cofilin1

Neben dem Ausschalten des Cofilin1-Proteins über molekulargenetische Methoden durch Einsatz verschiedener Mausmodelle, stellt die Aptamer-Technologie einen weiteren Ansatz dar, um spezifisch die Cofilin1-Aktivität zu regulieren. Aptamere als kurze Nukleotide können über ihre dreidimensionale Struktur spezifisch an ihr Zielprotein binden. In diesem Teil der Arbeit wird die Selektion eines RNA-Aptamers gegen Cofilin1 über SELEX beschrieben. Die SELEX ist ein sich wiederholender Prozess bestehend aus drei Schritten: 1. Selektion, die Inkubation einer Nukleinsäurebibliothek mit dem Zielmolekül; 2. Elution, die Separation der bindenden Nukleinsäuresequenzen von der Fraktion, die nicht bindet; 3. Amplifikation der bindenden Sequenzen.



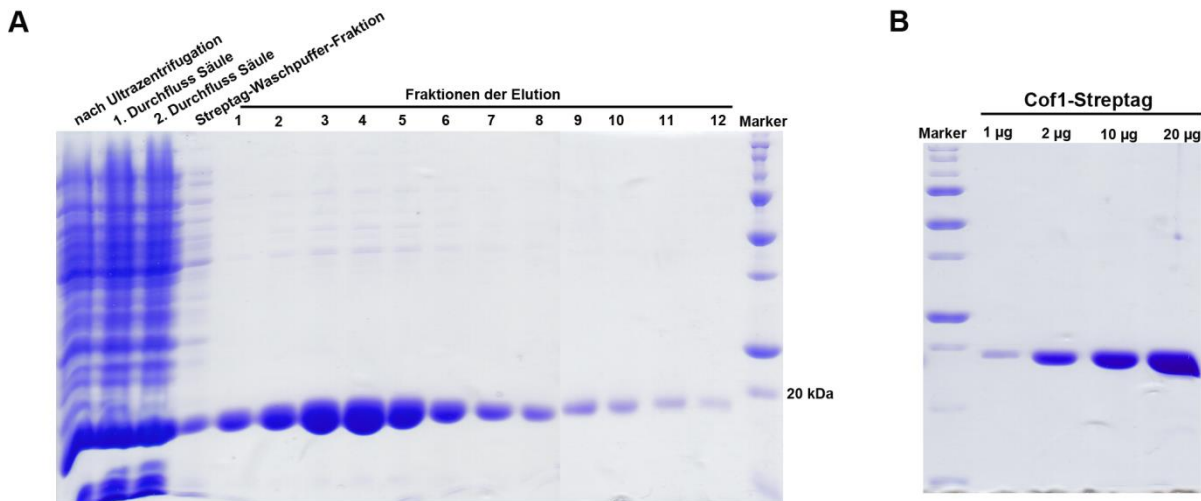
### 4.5.1. Vorbereitungen für die Aptamer-Selektion gegen Cofilin1

#### 4.5.1.1. Aufreinigung von rekombinantem Cofilin1-Strep-Tag-Protein

Für die Aptamer-Selektion musste das Cofilin1-Protein mit einem *Tag* versehen und in großen Mengen rekombinant gewonnen werden. Dies erfolgte mit Hilfe des Strep-Tags, der sowohl für die affinitätschromatographische Aufreinigung als auch für die spätere Kopplung des Proteins an magnetische *Beads* diente. Der Strep-Tag ist mit einer Länge von acht Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 1 kDa ein verhältnismäßig kleiner Tag, der den Vorteil bietet, dass er am Protein verbleiben kann, ohne dessen Konformation zu beeinflussen.

Dazu wurde zunächst die Sequenz für den Strep-Tag aus dem Vektor pASK-IBA43plus in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pMW172 über die Restriktionsschnittstellen für *StuI* und *EcoRI* subkloniert (siehe Vektorkarte im Anhang). Im folgenden Schritt wurde die cDNA des Cofilin1-Gens (aus dem Vektor pGEX-2T-Cofilin1, siehe Anhang) so in den Strep-Tag-pMW172-Vektor über die Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *XhoI* kloniert, dass das Konstrukt für ein Fusionsprotein mit C-terminalem Affinitäts-Tag kodiert (siehe Vektorkarte im Anhang). Die C-terminale Klonierung sorgt für eine optimale Exponierung des Fusionsproteins zu seinem Bindungspartner, wenn es beispielsweise für die SELEX an magnetische *Beads* gekoppelt wird.

Zur Aufreinigung des Cofilin1-Strep-Tag-Proteins wurde eine Kultur mit *E. coli*s, die diesen Vektor trugen, angeimpft, kultiviert und das Protein durch Induktion überexprimiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mittels Affinitäts-Chromatographie über eine mit Streptactin-Agarose befüllte Säule (siehe Abbildung 4.35).



**Abbildung 4.35: Aufreinigung von rekombinantem Cofilin1-Strep-Tag-Protein.** (A) Stufen der Aufreinigung des Cofilin1-Strep-Tag-Proteins im Coomassie-Gel. Nach der Ultrazentrifugation erhält man das *Cleared*-Lysat, welches zweimal über die Säule, befüllt mit Streptactin-*Beads*, geschickt wurde. Anschließend wurde die Säule mit Waschpuffer gewaschen und letztendlich das Protein von der Säule eluiert. (B) Vergleich verschiedener Mengen des Cof1-Strep-Tag-Proteins im Coomassie-Gel.

Nach der Überexpression des Fusionsproteins in *E. coli* wurden die Bakterien zunächst lysiert und dann ultrazentrifugiert, sodass man das *Cleared*-Lysat erhielt, welches neben dem gewünschten Fusionsprotein alle anderen löslichen Proteine beinhaltet, die Bakterien besitzen. Dieses wurde anschließend zur affinitätschromatographischen Aufreinigung auf eine Säule, befüllt mit Streptactin-*Beads*, gegeben, sodass das Fusionsprotein über den Strep-*Tag* an die *Beads* binden konnte und nicht mehr im Durchfluss enthalten war. Durch mehrmaliges Waschen der Säule wurde sichergestellt, dass sich kein anderes außer dem aufzureinigenden Protein mehr auf der Säule befand. Zuletzt wurde das Fusionsprotein mit Hilfe eines Desthiobiotin-haltigen Puffers von der Säule eluiert. Das Biotinderivat Desthiobiotin konkurriert mit dem Strep-*Tag* um die Bindung an das Streptactin und verdrängt es. Die Fraktionen 1-8 der Elution wurden letztendlich vereinigt. Zur Kontrolle wurde das aufgereinigte Cofilin1-Strep-*Tag*-Protein im Gel untersucht, welches bei den einzelnen Konzentrationen jeweils eine einzige Bande auf der Höhe von ca. 20 kDa zeigte.

### 4.5.1.2. Immobilisierung von rekombinantem Cofilin1-Strep-Tag-Protein

Zur Immobilisierung des Cofilin1-Strep-*Tag*-Fusionsproteins an eine Matrix wurde es an magnetische Streptactin-*Beads* gekoppelt.

T7 Promotor Region
randomisierte Region

5'-ATAGCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGGGGAAGTCTACATTT—————TTTCTGGAGTTGACGAAGCTT-3'

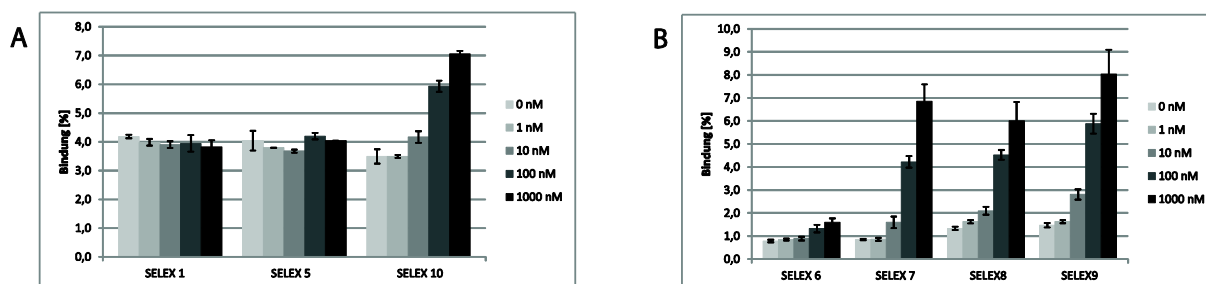
5'-Primer
3'-Primer

#### 4.5.2. Durch SELEX erfolgt eine Anreicherung von potentiellen Cofilin1-Aptamersequenzen

Im Anschluss daran wurden die SELEX-Runden 1, 5 und 10 im Filterbindungsassay auf die Anreicherung bindender Sequenzen untersucht. Dazu wurden Oligonukleotide dieser SELEX-Runden im Zuge einer Transkription radioaktiv markiert und im Assay die Bindung an 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM Cofilin1 analysiert. Bei diesem Assay werden Proteine von

einer Nitrocellulosemembran zurückgehalten. Bindet wiederum eine radioaktiv markierte Sequenz an das zurückgehaltene Protein, kann dies nachgewiesen werden.

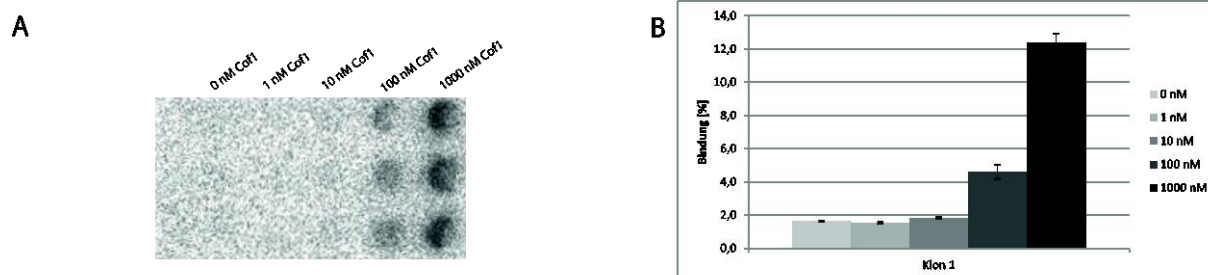
Im Filterbindungsassay konnte gezeigt werden, dass die 10. SELEX-Runde bei steigender Proteinmenge bindende Sequenzen aufweist. Um zu zeigen, in welchem Zyklus die Anreicherung begonnen hat, wurden auf die gleiche Weise ebenfalls die SELEX-Runden 6, 7, 8 und 9 diesem Assay unterzogen. Hierbei wurde deutlich, dass SELEX-Runde 7 die erste ist, in der Bindung nachweisbar ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.37 zusammengefasst.



**Abbildung 4.37: Untersuchung der einzelnen SELEX-Runden im Filterbindungsassay auf die Anreicherung bindender Sequenzen.** Analysiert wurden die Runden 1, 5 und 10 (A) sowie die Runden 6, 7, 8 und 9 (B). Die Sequenzen wurden im Zuge einer Transkription radioaktiv markiert und die Bindung gegen 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM Cofilin1-Strep-Tag untersucht. Für die Auswertung wurden die erhaltenen Signale mit dem Computerprogramm Multi Gauge densitometrisch analysiert, die erhaltenen Werte der Proben (Triplikate) gegen die Ausgangsstrahlung des jeweiligen Transkriptionsansatzes normalisiert und das Ergebnis graphisch aufgetragen.

### 4.5.3. Die Überprüfung der Monoklonale liefert eine bindende Sequenz

Nachdem im Filterbindungsassay gezeigt werden konnte, dass eine erste Anreicherung bindender Sequenzen in SELEX-Runde 7 stattgefunden hat, wurden Sequenzen dieser und der letzten SELEX-Runde über TA-Klonierung in einen Vektor eingebracht und anschließend sequenziert. Durch die Sequenzierung wurden elf verschiedene Sequenzen erhalten, die teilweise mehrfach und in beiden klonierten SELEX-Runden vorkamen. Diese Sequenzen wurden wiederum einzeln im Filterbindungsassay auf ihre Affinität zu Cofilin1-Strep-Tag analysiert. Vor der Transkription mussten diese zunächst aus dem Vektor herausamplifiziert werden, da dieser ebenfalls den Promotor der T7-Polymerase enthält. Durch das Sequenz-Screening ergab sich, dass eine einzige Sequenz an das Zielprotein bindet (siehe Abbildung 4.38).



**C**

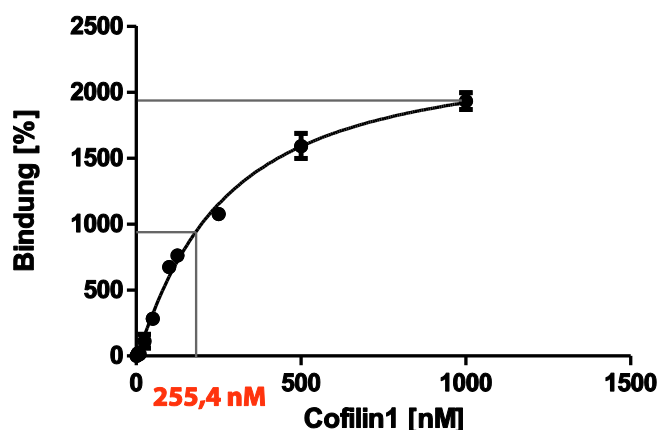
**5'**CCGCCCCACGUCCGUAUCCCCGUAUAAAGCCACCCACCCAUCAUGCACGG**3'**

**Abbildung 4.38: Untersuchung von Klon 1 im Filterbindungsassay auf Bindungsaffinität für das Zielprotein Cofilin1.** (A) Ergebnis des Assays, wobei die Bindung gegen 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM Cofilin1-Strep-Tag untersucht wurde. (B) Für die Auswertung wurden die erhaltenen Signale mit dem Computerprogramm Multi Gauge densitometrisch analysiert, die erhaltenen Werte der Proben (Triplikate) gegen die Ausgangsstrahlung des jeweiligen Transkriptionsansatzes normalisiert und das Ergebnis graphisch aufgetragen. (C) Die RNA-Sequenz von Klon 1 ist 50 nt lang. Gezeigt ist ausschließlich die bindende Sequenz. Die konstanten Primerbinderegionen im 5'- und 3'-Bereich sind nicht dargestellt.

Die Sequenz von Klon1 kam sowohl einmal unter den Oligonukleotiden der SELEX-Runde 7 und einmal in SELEX-Runde 10 vor. Es wird deutlich, dass die Bindung der einzelnen Sequenz stärker ist (12 % Bindung) als die der untersuchten Pools der SELEX-Runde 7 (7 % Bindung) und der SELEX-Runde 10 (7 % Bindung) (vgl. Abbildung 4.37).

#### 4.5.3.1. $K_D$ -Wert-Bestimmung des potentiellen Cofilin1-Aptamers

Zur Beurteilung der Stärke der Bindung des potentiellen Cofilin1-Aptamers wurde mit Hilfe eines Filterbindungsassays eine  $K_D$ -Wert-Bestimmung durchgeführt. Hierbei wurden diesmal zehn verschiedene Konzentrationen des Zielproteins Cofilin1-Strep-Tag untersucht (1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM). Das Ergebnis ist in Abbildung 4.39 dargestellt.

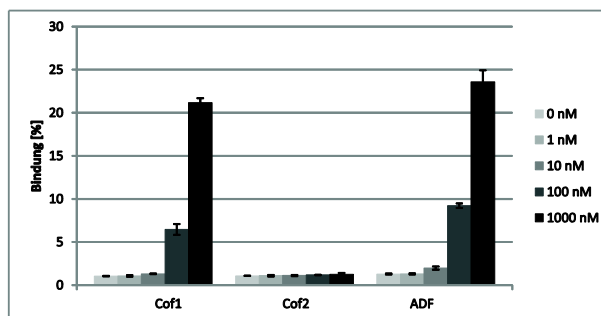


**Abbildung 4.39: Bestimmung des  $K_D$ -Werts des potentiellen Cofilin1-Aptamers.** Zur Ermittlung der Dissoziationskonstante wurde ein Filterbindungsassay durchgeführt, wobei die Bindung gegen 1 nM, 2,5 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM und 1000 nM Cofilin1-Strep-Tag untersucht wurde. Der  $K_D$ -Wert wurde auf Grundlage des Hill-Koeffizienten mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism bestimmt.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante ergibt einen Wert von 255,4 nM bei den gewählten Selektionsbedingungen (siehe Abschnitt 4.5.2). Dieser  $K_D$ -Wert liegt, laut Erfahrungen der AG Mayer, im erwarteten Bereich.

#### 4.5.3.2. Untersuchung der Spezifität des potentiellen Cofilin1-Aptamers

Cofilin1 ist Mitglied der ADF/Cofilin-Proteinfamilie, der weiterhin die beiden Proteine Cofilin2 und ADF angehören. Zur Untersuchung der Spezifität des selektierten Cofilin1-Aptamers wurde ein weiterer Filterbindungsassay durchgeführt, in welchem neben der Bindung an Cofilin1 auch die Bindung an Cofilin2 und ADF analysiert wurde. Für diese Untersuchung wurden Proteine verwendet, die keinen Tag mehr trugen. Das Ergebnis des Assays ist in Abbildung 4.40 dargestellt.



**Abbildung 4.40: Spezifität des potentiellen Cofilin1-Aptamers.** Die Bindung gegen 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM Cofilin1, Cofilin2 und ADF wurde im Filterbindungsassay untersucht. Für die Auswertung wurden die erhaltenen Signale mit dem Computerprogramm Multi Gauge densitometrisch analysiert, die erhaltenen Werte der Proben (Triplikate) gegen die Ausgangsstrahlung des jeweiligen Transkriptionsansatzes normalisiert und das Ergebnis graphisch aufgetragen.

Es wird deutlich, dass die gefundene Aptamer-Sequenz nicht nur eine Affinität für Cofilin1, sondern auch für ADF besitzt, nicht aber für Cofilin2. Dabei scheint die Bindung des Aptamers an Cofilin1 und ADF vergleichbar.

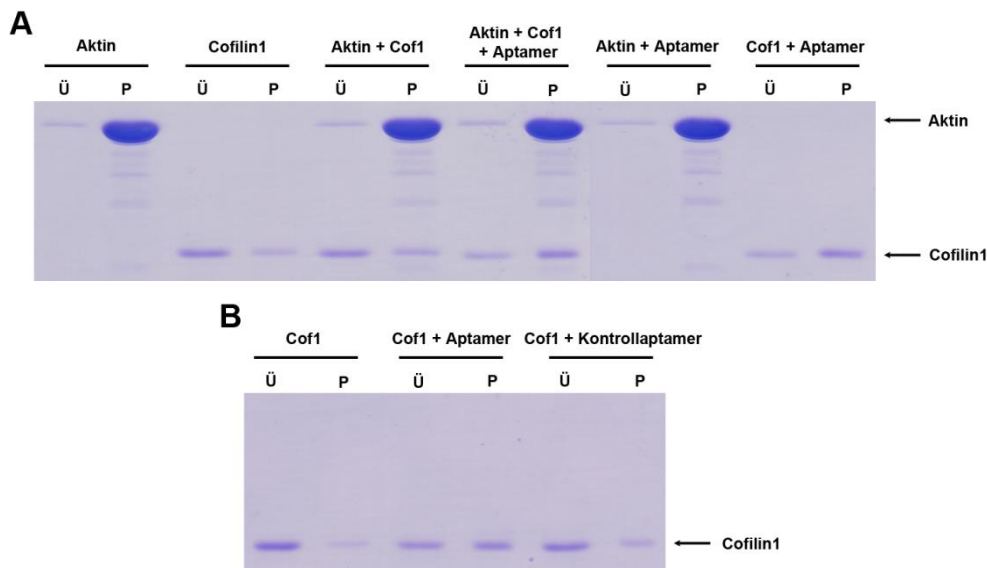
#### 4.5.4. Untersuchung der Auswirkung der Aptamer-Sequenz auf Cofilin1 mittels Aktin-Assays

Nachdem nun eine bindende Sequenz für das Zielprotein Cofilin1 identifiziert werden konnte, wurde dieses Cofilin1-Aptamer in verschiedenen Aktin-Assays auf seine Fähigkeit, die Cofilin1-Bindung und -Aktivität gegenüber Aktin zu beeinflussen, untersucht.

##### 4.5.4.1. Das Cofilin1-Aptamer im Aktin-Pelleting-Assay

Der Aktin-Pelleting-Assay wird verwendet, um zu prüfen, ob das Cofilin1-Aptamer einen Einfluss auf die Aktin-Bindefähigkeit von Cofilin1 nimmt. Mit Hilfe von Ultrazentrifugation kann G- von F-Aktin getrennt werden, sodass sich im Anschluss das G-Aktin im Überstand und das F-Aktin im Pellet befindet. Wie bereits gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 4.1.1.2), bindet Cofilin1 überwiegend an F-Aktin und ist somit zum Großteil in der Pelletfraktion zu finden.

Dazu wurde Cofilin1-Strep-Tag und das Cofilin1-Aptamer zunächst zusammen unter polymerisierenden Bedingungen für 10 min vorinkubieren gelassen. Nach Hauptinkubation zusammen mit Aktin wurden die Proben ultrazentrifugiert und dann Überstand- gegen Pelletfraktion mit SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4.41 zusammengefasst.



**Abbildung 4.41: Untersuchung der Auswirkungen des Cofilin1-Aptamers auf Cofilin1 im Aktin-Pelleting-Assay.** Es wurden 12  $\mu\text{M}$  G-Aktin mit 2,5  $\mu\text{M}$  Cofilin1-Strep-Tag und 2,5  $\mu\text{M}$  Aptamer in einen Ansatz gegeben und Polymerisationspuffer mit pH 7,0 verwendet. Bei den Kontrollansätzen wurden entsprechend der Beschriftung bestimmte Komponenten weggelassen. Als Kontrollaptamer diente eine nicht bindende Sequenz aus SELEX-Runde 7. Die Coomassie-Gele zeigen die Überstände (Ü) aufgetragen im Vergleich zum Pellet (P). In (A) steht die Untersuchung des Einflusses des Cofilin1-Aptamers gegenüber Aktin und Cofilin1 im Vordergrund, während in (B) die Auswirkung des Cofilin1-Aptamers auf Cofilin1 im Mittelpunkt stand.

Die Ergebnisse der Kontrollassays zeigen, dass bei der Probe, die lediglich Aktin enthält, der überwiegende Anteil entsprechend der Erwartungen als F-Aktin im Pellet vorzufinden ist. Bei der Cofilin1-Kontrolle befindet sich erwartungsgemäß der größte Anteil dieses Proteins im Überstand. Allerdings ist auch in der Pelletfraktion Cofilin1 zu finden. Dies war in den vorangegangenen Assays (Abschnitt 4.1.1.2) nicht der Fall und ist entweder auf Aggregatbildung oder den Strep-Tag zurückzuführen (EWINGER, 2012). In der Kontrolle mit Aktin und Cofilin1 ist mehr Cofilin1 in der Pelletfraktion zu finden als bei der Cofilin1-Kontrolle, da Cofilin1 an F-Aktin bindet. In der Probe, in welcher zusätzlich zu Aktin und Cofilin1 nun auch das Aptamer hinzugefügt wurde, konnte gezeigt werden, dass das Cofilin1-Aptamer anscheinend dafür sorgt, dass mehr Cofilin1 in der Pelletfraktion zu finden ist. Auf das Aktin allein scheint das Cofilin1-Aptamer keinen Einfluss zu nehmen, wie sich in der Aktin+Aptamer-Kontrolle zeigt. Bei der Cofilin1+Aptamer-Kontrolle wird deutlich, dass das Cofilin1-Aptamer auch ohne Gegenwart von Aktin dafür sorgt, dass Cofilin1 pelletiert wird. Die Cofilin1-Bande in der Pelletfraktion ist in seiner Intensität vergleichbar mit der aus der Probe in der Aktin, Cofilin1 und Aptamer zusammen untersucht wurden.

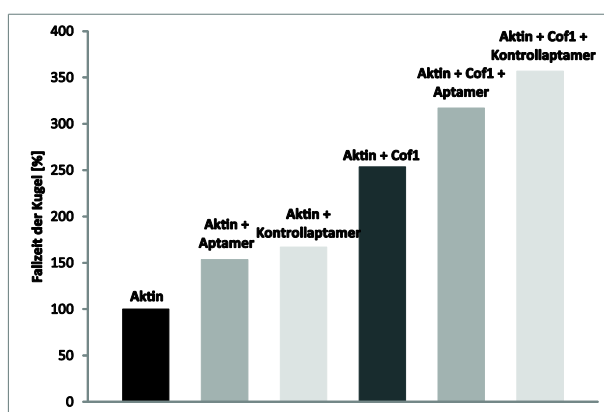


Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Cofilin1-Aptamer einen spezifischen Einfluss auf Cofilin1 nimmt, da in der Probe mit Cofilin1 und Kontrollaptamer nur geringfügig mehr Cofilin1 im Pellet zu finden ist, als in der Cofilin1-Kontrolle.

Der Assay macht deutlich, dass das Cofilin1-Aptamer spezifisch an Cofilin1 bindet und dafür sorgt, dass es pelletiert wird.

#### 4.5.4.2. Das Cofilin1-Aptamer im *Falling-Ball*-Assay

Um gezielt den Einfluss des Cofilin1-Aptamers auf die Aktin depolymerisierende Aktivität von Cofilin1 zu untersuchen, wurde der *Falling-Ball*-Assay durchgeführt. Dieser Assay ermöglicht die Analyse des Einflusses Aktin bindender Proteine auf die Aktinpolymerisation. Dazu wird die Viskosität einer Lösung, die sich aufgrund des Polymerisationsgrads von Aktin verändert, in einem Kugelfallviskosimeter über die Fallzeit bestimmt. Ändert sich die Viskosität der Lösung, ändert sich auch gleichzeitig die Zeit, die eine Kugel für das Zurücklegen einer definierten Strecke benötigt. Für diese Untersuchung wurde analog zum *Pelleting*-Assay, Cofilin1 und das Cofilin1-Aptamer zunächst zusammen unter polymerisierenden Bedingungen für 10 min vorinkubieren gelassen. Nach Hauptinkubation zusammen mit Aktin wurde dann die Viskosität der Flüssigkeit überprüft. Abbildung 4.42 zeigt die graphische Auswertung der Analyse.



**Abbildung 4.42: Untersuchung der Auswirkungen des Cofilin1-Aptamers auf Cofilin1 im *Falling-Ball*-Assay.** Es wurden 12  $\mu\text{M}$  G-Aktin mit 2,5  $\mu\text{M}$  Cofilin1-Strep-Tag und 2,5  $\mu\text{M}$  Aptamer in einen Ansatz gegeben und Polymerisationspuffer mit pH 7,0 verwendet. Bei den Kontrollansätzen wurden entsprechend der Beschriftung bestimmte Komponenten weggelassen. Als Kontrollaptamer diente eine nicht bindende Sequenz aus SELEX-Runde 7. Dargestellt ist die graphische Auswertung der Analyse, wobei die Fallzeit der Kugel in der Aktin-Kontrolle auf 100 % und alle weiteren Zeiten dazu ins Verhältnis gesetzt wurden.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Aktin-Kontrolle entsprechend der Erwartungen die niedrigste Viskosität besitzt. Durch die Zugabe des Aptamers erhöht sich die Viskosität der

Lösung. Dies ist für das Cofilin1-Aptamer sowie für das Kontrollaptamer der Fall. Das Aptamer hat offensichtlich einen positiven Effekt auf die Polymerisation von Aktin. In der Kontrolle, in der die Auswirkung von Cofilin1 auf Aktin untersucht wurde, zeigt sich eine noch stärkere Erhöhung der Viskosität der Lösung. Die höchste Viskosität weisen die Proben auf, in denen Aktin, Cofilin1 und das Cofilin1-Aptamer bzw. das Kontrollaptamer untersucht wurden. Sehr wahrscheinlich addiert sich jeweils der polymerisierende Effekt, den die Aptamersequenzen und das Cofilin1 auf das Aktin ausüben.

### **4.5.5. Re-SELEX zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität der gefundenen Aptamer-Sequenz**

Zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität der selektierten Sequenz des Cofilin1-Aptamers wurde eine Re-SELEX durchgeführt. Dazu wurde basierend auf der erhaltenen Sequenz des Cofilin1-Aptamers eine neue Bibliothek in Auftrag gegeben, bei welcher in der 50 nt langen, ursprünglich randomisierten Region die Nukleotide mit einer Mutageneserate von 15 % (z.B. „A“ → Einsatz von 75 % „A“, 5 % „C“, 5 % „G“, 5 % „T“) eingebaut wurden (Synthese durch ELLA Biotech). Der Grund für die Synthese dieser Bibliothek ist die Tatsache, dass die Sequenzdiversität von  $4^{50}$  verschiedenen Möglichkeiten der Ausgangsbibliothek nur eine theoretische Diversität darstellt. Mit der neuen Bibliothek sollten nun noch weitere Sequenzen im Pool vorhanden sein, die eine geringfügig abgewandelte Sequenz des Cofilin1-Aptamers aufweisen und somit durch eine weitere SELEX gegebenenfalls eine Sequenz selektiert werden konnte, die spezifischer und sensitiver als die bisher erhaltene ist.

Um eine Erhöhung der Spezifität während der Re-SELEX zu gewährleisten, sollte vor jeder eigentlichen SELEX-Runde zunächst gegen ADF vorselektiert werden, damit alle Sequenzen, die eine Affinität gegen dieses Mitglied der ADF/Cofilin-Proteinfamilie haben, ausgeschlossen werden. Dazu musste auch das ADF-Protein mit einem *Tag* versehen (siehe Vektorkarte im Anhang) und in großen Mengen gewonnen werden. Dies erfolgte analog zum Cofilin1-Protein wie in Abschnitt 4.5.1.1. beschrieben.

Vor Beginn der Re-SELEX wurde die mutagenisierte Bibliothek zunächst im Filterbindungsassay auf ihre Affinität zu den beiden Zielproteinen Cofilin1 und ADF untersucht (Daten nicht gezeigt), wobei keine Bindung im Konzentrationsbereich von 1-1000 nM Protein nachgewiesen werden konnte.

Für die Re-SELEX wurde das Cofilin1- und auch das ADF-Strep-*Tag*-Fusionsprotein an magnetische Streptactin-*Beads* gekoppelt. Dies erfolgte für das ADF wie in Abschnitt 3.5.1.1 beschrieben, während von Cofilin1 nur 1/5 der Protein- und somit auch der *Bead*-Menge eingesetzt wurde, um eine Erhöhung der Sensitivität zu bedingen.

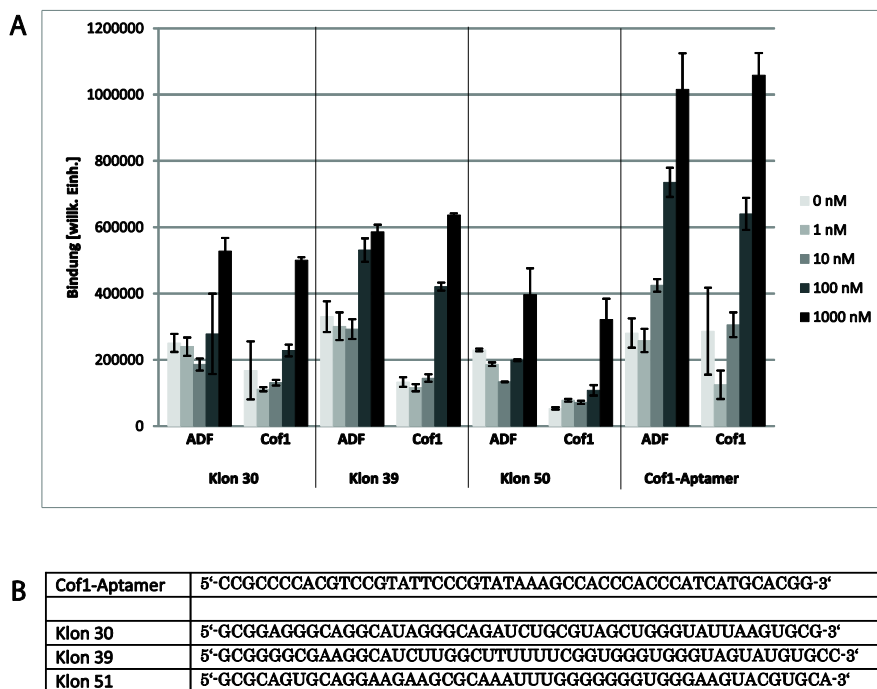
Zur Re-Selektion wurde die SELEX wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde zwischen Negativselektion gegen ungekoppelte *Beads* und eigentlicher Selektion eine Vorinkubation gegen ADF vorgeschaltet, die unter den gleichen Bedingungen erfolgte, wie die eigentliche Selektion. Während der zweiten SELEX-Runde wurden offenbar während der Vorinkubation mit ADF alle Sequenzen, die potentiell auch an Cofilin1 binden, abgefangen. Aus diesem Grund wurde die Strategie verändert und ab der SELEX-Runde 2 ohne Vorinkubation gegen ADF gearbeitet und dies bis zu Runde 6 fortgeführt.

Im Anschluss daran wurden die Re-SELEX-Runden 1, 3 und 6 im Filterbindungsassay auf die Anreicherung bindender Sequenzen hin untersucht (Daten nicht gezeigt) und festgestellt, dass in Runde 3 und 6 solche vorhanden waren. Diese besaßen jedoch eine Affinität für Cofilin1 und für ADF. Die Sequenzen dieser beiden Runden wurden wiederum über TA-Klonierung in einen Vektor eingebracht und sequenziert. Die Sequenzierung lieferte 10 Oligonukleotide, von denen zwei Sequenzen doppelt vorkamen und eine weitere eine 46 %ige Ähnlichkeit zur ursprünglichen Cofilin1-Aptamer-Sequenz hatte. Allerdings konnte für keine dieser Sequenzen im Filterbindungsassay eine Affinität zu Cofilin1 oder zu ADF nachgewiesen werden.

Da laut Bindungsassay der angereicherten Sequenzen aus Re-SELEX-Runde 3 und 6 aber offenbar bindende Sequenzen vorhanden sein mussten, wurden nun Klone „blind“, ohne ihre Sequenzabfolge zu kennen, in der Filterbindung untersucht. Um einen hohen Durchsatz gewährleisten zu können, wurde die Aufreinigung der Transkription ausgelassen (vgl. Abschnitt 3.5.2). Dies hatte keinen Einfluss auf die Bindung, was mit Hilfe der Cofilin1-Aptamer-Sequenz als Kontrolle bestätigt werden konnte. Weiterhin wurde im Assay ausschließlich die Bindung gegen 1000 nM Cofilin1-Strep-*Tag* analysiert. Die Untersuchung von insgesamt 92 Sequenzen lieferte 3 Klone, die eine Bindung zeigten.

Um diese Klone detaillierter zu untersuchen, wurden sie in einem weiteren Filterbindungsassay analysiert. Im Assay wurde auf eine Bindung an 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM Cofilin1-Strep-*Tag* als auch ADF-Strep-*Tag* untersucht. Abweichend zur bisherigen Durchführung wurde für diesen Assay die Ausbeute der radioaktiven Markierung

nach der Transkription im Szintillationszähler bestimmt und die Proben so verdünnt, dass alle die gleiche Strahlung aufwiesen und somit jeweils die gleiche Menge an Radioaktivität eingesetzt wurde. Das Ergebnis dieses Assays und der Sequenzierung ist in Abbildung 4.43 dargestellt.



**Abbildung 4.43: Untersuchung der drei potentiellen Klone der Re-SELEX im Filterbindungsassay.** Analysiert wurden die Klone 30, 39, 50 und die bisherige Cofilin1-Aptamersequenz als Kontrolle (**A**). Die Sequenzen wurden im Zuge einer Transkription radioaktiv markiert und die Bindung gegen 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM ADF-Strep-Tag bzw. Cofilin1-Strep-Tag untersucht. Für die Auswertung wurden die erhaltenen Signale mit dem Computerprogramm Multi Gauge densitometrisch analysiert und die erhaltenen Werte der verrechneten Proben (Triplikate) graphisch aufgetragen. In (**B**) sind die RNA-Sequenzen der drei untersuchten Klone im Vergleich zur Sequenz des Cofilin1-Aptamers zusammengestellt. Gezeigt ist ausschließlich die bindende Sequenz. Die konstanten Primerbinderegionen im 5'- und 3'-Bereich sind nicht dargestellt.

Das Ergebnis der Analyse zeigt, dass alle in der Re-SELEX gefundenen Sequenzen eine niedrigere Affinität zu Cofilin1 bzw. ADF aufweisen als das bisher selektierte Cofilin1-Aptamer. Weiterhin gibt es bei allen Sequenzen nur minimale Unterschiede in ihrer Bindung an die beiden Proteine. Der Klon 39 weist die höchste Affinität auf. Das zeigt sich insbesondere darin, dass die Bindung bei der zweithöchsten Proteinkonzentration von 100 nM ebenfalls vergleichsweise hoch ist, was bei den anderen Sequenzen nicht der Fall ist. Diese Tendenz ist für die Bindung an ADF am stärksten. Bei der höchsten Proteinkonzentration von 1000 nM zeigt dieser Klon aber eine etwas stärkere Bindung an Cofilin1.

Es wird deutlich, dass durch die Re-SELEX keine Sequenz gefunden werden konnte, die eine höhere Sensitivität oder eine ausschließliche Spezifität für Cofilin1 aufweist.

# 5. Diskussion

Cofilin1 ist, neben Cofilin2 und ADF, eines der drei Mitglieder der ADF/Cofilin-Proteinfamilie, deren wichtigste physiologische Funktion darin besteht, Aktinfilamente an ihrem langsam wachsenden Ende zu depolymerisieren. Dabei wird monomeres Aktin freigesetzt, wodurch es zu einer Erhöhung der Aktindynamik kommt (BERNSTEIN, BAMBURG, 2010). Da das Aktinzytoskelett für eine Vielzahl von Prozessen in der Zelle sehr relevant ist, wie beispielsweise für die Zellbewegung, den intrazellulären Transport, Signaltransduktionen und für die Genexpression, muss eine strikte Regulation der Aktin bindenden Proteine gewährleistet sein. Die Kontrolle der Cofilin1-Aktivität erfolgt über Phospho-, Phospholipid- und Redox-Regulation.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Cofilin1 und Aktindynamik speziell in T-Zellen untersucht. Samstag et al. konnten mit Hilfe von *in vitro*-Studien zeigen, dass die Regulation der Aktindynamik durch Cofilin1 in diesen Zellen nicht nur für die Migration, sondern auch insbesondere für die Aktivierung der T-Zellen und die Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen T-Zellen und Antigen präsentierenden Zellen essentiell ist (SAMSTAG et al., 2013). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Cofilin1 in T-Zellen direkt im Organismus *in vivo* mittels verschiedener Mausmodelle untersucht.

Mittels Westernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass sowohl in Thymozyten als auch in T-Zellen der sekundären lymphatischen Organe, Lymphknoten, Milz und Blut, Cofilin1 das einzige exprimierte Mitglied dieser Proteinfamilie darstellt. Die anderen beiden Mitglieder der Proteinfamilie, Cofilin2 und ADF, konnten nicht nachgewiesen werden. Vorherige Arbeiten gaben bereits Hinweise darauf (GURNIAK et al., 2005; GURNIAK et al., 2014, Supplement; SALZ, 2011). Allerdings wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal Proben analysiert, die ausschließlich T-Zellen enthielten. Das Fehlen von Cofilin2 in peripheren T-Zellen konnte im Zuge dieser Untersuchungen erstmals nachgewiesen werden.

Die Halbwertszeit ist eine übergeordnete Regulationsebene von Proteinen, worüber beispielsweise sichergestellt werden kann, dass diverse Proteine rasch eliminiert werden können, sodass die Zelle sich an schnell ändernde Bedingungen anpassen kann. Die Halbwertszeiten von Proteinen variieren zwischen einigen Sekunden bis hin zu Tagen (MAIER et al., 2009). Eine weitere zentrale Beobachtung, die in dieser Arbeit gemacht wurde ist, dass das Cofilin1-Protein eine relativ große Halbwertszeit besitzt, die im Bereich von Tagen liegt.

Dies ist für alle nachfolgenden Betrachtungen relevant. Durch die induzierte Rekombination des Cofilin1-Gens in T-Zellen wird dieses auf DNA-Ebene erfolgreich deletiert, während das Cofilin1-Protein noch vorhanden ist. Diese Beobachtung wird in Abschnitt 5.3 im Kontext der Versuche eingehend erläutert.

## 5.1. Die Rolle des Phosphorylierungsstatus für die Cofilin1-Aktivität *in vitro*

Die Aktivität von Cofilin1 wird auf verschiedene Weise kontrolliert. Die Phospho-Regulation erfolgt an der Aminosäure Serin3 des Cofilin1-Proteins, welche im Exon 2 des Cofilin1-Gens kodiert wird. In seinem aktiven Zustand ist Cofilin1 dephosphoryliert, in seinem inaktiven Zustand liegt es phosphoryliert vor. Phosphoryliertes Cofilin1 ist weder in der Lage F- noch G-Aktin zu binden und kann somit keine Aktivität gegenüber Aktin ausüben (MORIYAMA et al., 1996).

Durch Einführung zweier verschiedener Mutationen, die zum Austausch des Serins zu Alanin bzw. Aspartat führen, erhält man konstitutiv aktives bzw. inaktives Cofilin1 (NAGAOKA et al., 1996). Alanin kann auf Grund des Fehlens einer Hydroxylgruppe nicht mehr phosphoryliert werden und ist somit dauerhaft aktiv, während Aspartat dagegen durch den Besitz einer weiteren Carboxylgruppe eine Phosphorylierung imitiert, wodurch es permanent inaktiv ist.

Die Auswirkungen dieser beiden Mutationen auf die Fähigkeit von Cofilin1, Aktin zu binden und es zu modifizieren, wurden in verschiedenen *in vitro* Assays untersucht. Für die Assays wurde alpha-Aktin aus Aktin-Aceton-Puder von Kaninchen isoliert (SPUDICH, WATT, 1971) und mit Hilfe der Äkta-FPLC F-Aktin und störende Proteine entfernt, sodass letztendlich pures G-Aktin vorlag. Für die Gewinnung der rekombinanten Cofilin1-Proteine wurde auf GST-Überexpressionsvektoren zurückgegriffen, in welchen die Sequenzen der beiden Cofilin1-Mutationen und die des Cofilin1-WTs als Fusionsproteine kodiert vorlagen. Diese waren in *E. coli* transformiert, sodass die Proteine als GST-Fusionsproteine rekombinant überexprimiert und erfolgreich aufgereinigt werden konnten. Durch anschließende Abspaltung des GST-Tags mittels Thrombin wurden reines Cofilin1-Ala-, Cofilin1-Asp- und Cofilin1-WT-Protein erhalten.

Zunächst wurden im Aktin-Pelleting-Assay die Proteine hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, Aktin zu binden. Dazu wurde G-Aktin zusammen mit dem zu untersuchenden Protein unter polymerisierenden Bedingungen inkubieren gelassen und anschließend die

Probe ultrazentrifugiert. Dabei sedimentiert F-Aktin, während G-Aktin im Überstand verbleibt. Ist das Protein in der Lage F-Aktin zu binden, findet man es demnach in der Pelletfraktion (BROWN et al., 1982). Mit diesem Assay konnte zunächst die pH-Abhängigkeit der Aktinpolymerisation bestätigt werden. Ein niedriger pH-Wert begünstigt die Polymerisation von Aktin (ZIMMERLE, FRIEDEN, 1988; CARRAWAY, CARRAWAY, C. A. C, ©1992). Der Kontrollassay, in welchem ausschließlich Aktin ohne Gegenwart anderer Proteine untersucht wurde, zeigt erwartungsgemäß eine stärkere F-Aktinbande in der Pelletfraktion bei dem Polymerisationspuffer mit einem niedrigeren pH-Wert. Die Aktinpolymerisation ist eine Gleichgewichtsreaktion, sodass zu keinem Zeitpunkt das komplette G-Aktin gebunden im Filament vorliegt (ALBERTS, 2011). Darauf ist das Vorhandensein von geringen G-Aktin-Mengen in der Überstandfraktion im Aktin-Kontrollassay zurückzuführen. Durch die Untersuchung des Proteins BSA in diesem Assay konnte bestätigt werden, dass Proteine, welche nicht an Aktin binden, trotz Anwesenheit von F-Aktin in der Überstandfraktion verbleiben. Weiterhin wurde sichergestellt, dass sowohl das Cofilin1-WT-Protein als auch die beiden mutierten Cofilin1-Proteine in Abwesenheit von F-Aktin nicht pelletieren. Mit Hilfe dieser Kontrollen konnte sichergestellt werden, dass sich mit diesem Assay die Bindung von Proteinen an F-Aktin nachweisen lässt.

Das Cofilin1-WT-Protein bindet an F-Aktin (NISHIDA et al., 1984), sodass es überwiegend in der Pelletfraktion, in geringen Mengen aber auch im Überstand zu finden ist. Bei niedrigerem pH-Wert geht geringfügig mehr Cofilin1-Protein in die Pelletfraktion. Da, wie beschrieben, bei niedrigerem pH-Wert mehr F-Aktin vorliegt, kann somit auch mehr Cofilin1-Protein an die Filamente binden. Das auch in der Überstandfraktion Cofilin1-Protein zu finden ist, lässt sich damit begründen, dass es auch an G-Aktin bindet ((CARLIER et al., 1997): Cofilin1-Analogon in *A. thaliana*). Die Cofilin1-Proteine wurden in Bakterien überexprimiert, sodass sie in ihrer aktiven, dephosphorylierten Form vorliegen. In Bakterien sind die notwendigen Enzyme zur Regulation der Aktivität über Phosphorylierung nicht vorhanden. Somit ist das Vorkommen von Cofilin1-WT-Protein in der Überstandfraktion nicht auf das Vorhandensein inaktiven, phosphorylierten Cofilin1 zurückzuführen, sondern allein auf die Fähigkeit, Aktin zu binden.

Das konstitutiv aktive Cofilin1-Ala-Protein verhält sich erwartungsgemäß entsprechend dem Cofilin1-WT-Protein. Seine Bindung an Aktin scheint noch etwas stärker zu sein. Bei dem Ansatz mit niedrigem pH-Wert ist sogar das gesamte Cofilin1-Ala-Protein im Pellet zu finden.



Dagegen bindet das konstitutiv inaktive Cofilin1-Asp-Protein kaum an Aktin. Die Pelletfraktion weist nur eine minimale Menge auf, was eventuell auf eine Restaktivität dieses Proteins zurückzuführen sein kann. Die Carboxylgruppe des Aspartats imitiert zwar eine Phosphorylierung, hat aber aufgrund der Vierbindigkeit des Kohlenstoffs eine andere Ladungsverteilung als der fünfbindige Phosphor. Dies könnte eine Erklärung für die nicht vollständige Inaktivität dieses Proteins darstellen.

Mit dem Pyren-Aktin-Assay wurde weiterhin die Auswirkung der Cofilin1-Mutationen auf die Kinetik der Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation untersucht. Diese Methode basiert darauf, dass die Fluoreszenz von Pyren markiertem G-Aktin beim Einbau in Filamente aufgrund des *Stacking Effects* bis zu einem Faktor von 20 zunimmt (COOPER et al., 1983). Haben die Proteine einen Einfluss auf die Kinetik, spiegelt sich dies somit in einer Änderung der Fluoreszenz des mit Pyren markierten Aktins wieder.

Im Polymerisations-Assay wurde mit Pyren markiertes G-Aktin mit den jeweiligen Cofilin1-Proteinen ansteigender Konzentrationen zusammengefügt und die Aktinpolymerisation anhand der Fluoreszenzzunahme ermittelt. Das Cofilin1-Ala-Protein zeigt schon bei seiner niedrigsten Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  den Verlauf einer Sättigungskurve, führt somit sehr schnell zum Erreichen der kritischen Konzentration und beschleunigt daher offenbar die Aktinpolymerisation am stärksten. Die Beschleunigung der Polymerisation kann darauf zurückzuführen sein, dass durch die depolymerisierende Cofilin1-Ala-Aktivität einerseits mehr G-Aktin frei wird, welches wiederum am schnell wachsenden Filamentende wieder eingebaut werden kann, sodass es zu einem erhöhten Aktin-Turnover kommt ((CARLIER et al., 1997): Cofilin1-Analogon in *A. thaliana*; (POLLARD, BORISY, 2003)). Andererseits kann es durch die schneidende Aktivität von Cofilin1-Ala zu einem vermehrten Vorhandensein von schnell wachsenden Aktinenden kommen, was die *on-rate*-Bindung (Assoziation) begünstigt, sodass früher der Gleichgewichtszustand erreicht wird ((MORIYAMA, YAHARA, 1999): Cofilin1 aus Hefe). Eine weitere Erklärung könnte der Nukleations-Effekt von Cofilin1 sein. Es konnte gezeigt werden, dass es bei hohen Cofilin1-Konzentrationen zur Nukleation von Aktin durch Cofilin1 kommt ((ANDRIANANTOANDRO, POLLARD, 2006): „Cofilin“ aus Hefe, *Acanthamoeba*, Mensch). Die flacheren Kurvenverläufe bei den beiden höchsten Cofilin1-Ala-Konzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  und 4  $\mu\text{M}$  könnten auf einen *Queching*-Effekt zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass Cofilin1 die Aktinfilamentfluoreszenz auslöschen kann ((BLANCHOIN, POLLARD, 1999): Actophorin aus *Acanthamoeba*). Somit spiegelt sehr wahrscheinlich der

Verlauf der Kurven bei diesen Konzentrationen nicht die Kinetik wieder, sondern ist auf *Quenching* zurückzuführen. Die stärkere Aktivität des Cofilin1-Ala- im Vergleich zu dem Cofilin1-WT-Protein wird durch die Ergebnisse des zuvor beschriebenen *Pelleting*-Assays bekräftigt, in welchem das Cofilin1-Ala-Protein eine etwas stärkere Bindung gegenüber F-Aktin gezeigt hat als das Cofilin1-WT-Protein. Das Cofilin1-Asp-Protein zeigt bei der höchsten Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  ebenfalls einen polymerisierenden Effekt. Dies bestärkt die Beobachtung aus dem *Pelleting*-Assay, dass es zwar noch eine verminderte Fähigkeit besitzt, F-Aktin zu binden und nun auch eine Restaktivität gegenüber Aktin zeigt.

Im Depolymerisations-Assay wurde mit Pyren markiertes F-Aktin mit den jeweiligen Proteinen ansteigender Konzentrationen zusammengefügt und die Aktindepolymerisation anhand der Fluoreszenzabnahme untersucht. In diesem Assay wurde die konstitutiv aktive Mutante im Vergleich zum WT-Protein analysiert. Bei den beiden niedrigeren Proteinkonzentrationen von 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  zeigen Cofilin1-Ala und Cofilin1-WT eine vergleichbare depolymerisierende Aktivität gegenüber F-Aktin, während bei den beiden höheren Konzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  und 4  $\mu\text{M}$  die Aktivität schwer zu beurteilen war. Da die Werte der Ausgangsfluoreszenzen bei den jeweiligen Proteinen schon sehr niedrig waren, wurden diese normalisiert, wobei jeweils der erste gemessene Wert auf 100% und die folgenden Werte entsprechend ins Verhältnis gesetzt wurden. Dieser Effekt ist vermutlich auf *Quenching* zurückzuführen. Bei den beiden höchsten Konzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  und 4  $\mu\text{M}$  ist dieser Effekt so stark, dass die depolymerisierende Aktivität der Proteine nicht mehr verlässlich beurteilt werden kann.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das konstitutiv aktive Cofilin1-Ala-Protein eine mindestens vergleichbare, wenn nicht sogar stärkere Bindung und Aktivität gegenüber Aktin zeigt als die WT-Form. Das konstitutiv inaktive Cofilin1-Asp-Protein zeigt dagegen nur eine minimale Bindung und noch eine minimale Restaktivität.

Um in Zukunft ein noch umfassenderes Verständnis der Form der Aktivität (Depolymerisation, Schneiden oder Nukleation) des konstitutiv aktiven Cofilin1-Ala-Proteins bzw. des konstitutiv inaktiven Cofilin1-Asp-Proteins gegenüber Aktin im Vergleich zum Cofilin1-WT-Proteins zu bekommen, bietet sich die weiterführende Untersuchung mittels TIRF (engl. *Total Internal Reflection Fluorescence*)-Mikroskopie an. Diese Mikroskopiertechnik ermöglicht die direkte Beobachtung einzelner Aktinfilamente und somit auch der Auswirkungen der zu untersuchenden Proteine auf Aktin (KUHN, POLLARD, 2005). Mit dieser

Methode könnte man zeigen, aufgrund welcher Aktivität von Cofilin1 es zu einer verstärkten Aktinpolymerisation kommt.

## 5.2. Die Bedeutung von Cofilin1 für T-Zellen *in vivo*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die *in vitro*-Aktivität von Cofilin1 gegenüber Aktin den Erwartungen entspricht, wurde nun der Fokus der Untersuchungen auf die Funktion dieses Proteins *in vivo* gerichtet.

Aus diversen *in vitro*-Untersuchungen ist bekannt, dass Cofilin1 eine bedeutende Rolle in T-Zellen spielt. Es ist in ruhenden T-Zellen phosphoryliert und inaktiv, während es in aktivierten T-Zellen dephosphoryliert und aktiv vorliegt (SAMSTAG et al., 1994). Eine Aktivierung von T-Zellen über den T-Zellrezeptorkomplex und die gleichzeitige Stimulation der Co-Rezeptoren CD2 oder CD28 ist nur möglich, wenn auch Cofilin1 aktiv ist (EIBERT et al., 2004). Cofilin1 scheint ein wichtiges Bindeglied zwischen der Aktivierung von T-Zellen und der Aktindynamik darzustellen (LEE et al., 2000) und ist in der immunologischen Synapse zu finden (SIMS et al., 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Cofilin1 auch eine Bedeutung bei der Migration von T-Zellen hat (NISHITA et al., 2005; KLEMKE et al., 2010). Darüber hinaus ist bekannt, dass Cofilin1 bei der Infektion mit dem HI-Virus eine Rolle spielt (WU et al., 2008; YODER et al., 2008; STOLP et al., 2009; WEN et al., 2014). Im Folgenden sollte nun die Funktion von Cofilin1 mit Hilfe verschiedener Mausmodelle *in vivo* gezielt untersucht werden.

Der vollständige KO von Cofilin1 führt zu früher embryonaler Letalität (GURNIAK et al., 2005) und muss durch den Einsatz eines konditionalen Cofilin1-Mausmodells umgangen werden. In diesem ist das Exon 2 des Cofilin1-Gens von loxP-Stellen flankiert, sodass durch die Verwendung gewebespezifischer Cre-Rekombinasen die Expression von Cofilin1 gezielt ausgeschaltet werden kann. Für die Deletion von Cofilin1 in T-Zellen wurden dazu zwei verschiedene Cre-Rekombinasen verwendet, die CD4- und die dLck-Cre-Rekombinase. Es war bereits bekannt, dass die Deletion von Cofilin1 vermittelt durch die CD4-Cre-Rekombinase im DN3-Stadium der T-Zellentwicklung (WOLFER et al., 2001) zu einer Blockade der T-Zellreifung führt und dadurch ein Emigrieren reifer T-Zellen in die peripheren lymphatischen Organe ausbleibt (SALZ, 2011). Um eine Deletion in reifen T-Zellen zu erhalten, wurde in dieser Arbeit die dLck-Cre-Rekombinase verwendet, welche in einer späten Phase der T-Zellreifung im Anschluss an die positive Selektion aktiv ist (ZHANG et al., 2005).

Durch den Einsatz von Rosy-Reportermäusen, die stromabwärts des ROSA26-Promotors eine gefloxt Stopp-Kassette gefolgt von der kodierenden Region des eYFP-Gens tragen (SRINIVAS et al., 2001), konnte die Aktivität der beiden Cre-Rekombinasen bestätigt werden. Die vergleichende, durchflusszytometrische Analyse von Rosy:CD4-Cre- und Rosy:dLck-Cre-Thymozyten mittels Marker für die Co-Rezeptoren CD4 und CD8 zeigt bei der CD4-Cre-Rekombinase bereits das Auftreten YFP-positiver, rekombinierter Zellen im DN-Stadium, während dies bei der dLck-Cre-Rekombinase erst in einfach positiven Thymozyten der Fall ist. Ab dem DN-Stadium nimmt der Anteil rekombinierter Zellen bei den Rosy:CD4-Cre-Thymozyten deutlich zu und ist in CD4-einfach positiven Zellen höher als bei CD8-einfach positiven Zellen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Rekombinase unter dem CD4-Promotor exprimiert wird und somit in den CD4-positiven Zellen fortwährend aktiv ist. In den CD8-positiven Zellen, die aus den doppelt positiven Thymozyten hervorgehen, ist der CD4-Promotor dagegen nur bis zum DP-Stadium aktiv. Die Rekombination in Rosy:dLck-Cre-Thymozyten beginnt dagegen erst ab dem einfach positiven Stadium der Thymozytenreifung und ist in CD8-Thymozyten auffällig stärker. Die verstärkte Rekombination in CD8-Zellen bei der dLck-Cre-Rekombinase ist bereits in der Literatur beschrieben (ZHANG et al., 2005). Da die dLck-Cre-Rekombinase dazu eingesetzt werden sollte, um eine Deletion von Cofilin1 in reifen T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen herbeizuführen, wurden weiterhin T-Zellen aus Lymphknoten, Milz und Blut von Rosy:dLck-Cre-Tieren analysiert. Dabei konnte ein hoher Anteil YFP-positiver Zellen nachgewiesen werden, der erwartungsgemäß in CD8-T-Zellen, mit einem Faktor von ca. 1,5, deutlich höher ist als in CD4-T-Zellen.

Bei der Deletion mittels des Cre/loxP-Systems gibt es immer Zellen, die dieser entkommen oder bei denen diese nur auf einem Allel, also heterozygot erfolgt, sodass eine 100 %ige Rekombinationseffizienz unmöglich ist.

### **5.2.1. Ist der Phosphorylierungsstatus von Cofilin1 für Thymozyten und T-Zellen von Bedeutung?**

Die bereits in Abschnitt 5.1 beschriebenen Mutationen im Cofilin1-Gen, die aufgrund eines Tripletaustausches im Serin3 des Exon 2 des Cofilin1-Gens *in vitro* nachweislich zu konstitutiv aktivem (Cofilin1-Ala) bzw. inaktivem Protein (Cofilin1-Asp) führen, liegen auch als Mausmutanten vor. Dies ermöglichte die Untersuchung der Bedeutung der Regulation der Aktivität von Cofilin1 in Thymozyten und peripheren T-Zellen *in vivo*. Es ist bekannt, dass in

aktivierten T-Zellen Cofilin1 in seiner aktiven Form vorliegt und einen bedeutenden Einfluss auf die Aktindynamik in diesen Zellen hat. In ruhenden T-Zellen liegt es dagegen phosphoryliert und somit inaktiv vor. (SAMSTAG et al., 1994) Die Untersuchungen in diesen *in vitro*-Studien erfolgten sowohl an PBTs als auch an immortalisierten humanen Jurkat-Zellen. Bei der letztgenannten Zelllinie muss berücksichtigt werden, dass es in diesen aufgrund einer Mutation zur konstitutiven Aktivierung des PI3K-Signalwegs kommt, wodurch Cofilin1 permanent aktiv ist (ABRAHAM, WEISS, 2004; WABNITZ et al., 2006).

Die Untersuchungen in dieser Arbeit erfolgten an Mäusen die so verpaart wurden, dass die Kreuzung Tiere lieferte, die nach CD4-Cre-vermittelter Deletion in T-Zellen ausschließlich das mutierte Allel exprimieren (Cof1<sup>fl/Ala</sup>:CD4-Cre bzw. Cof1<sup>fl/Asp</sup>:CD4-Cre).

Zunächst wurde mittels Southernblot-Analyse die Deletion des geflochten Cofilin1-Gens in beiden Mutanten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in Thymozyten jeweils nahezu ausschließlich die mutierten Allele vorliegen. In den Zellen aus Lymphknoten zeigt sich nach dieser Analyse noch das deutliche Vorhandensein des Cofilin1-flox-Allels. Dies würde auf den ersten Blick zu dem Schluss führen, dass in diesen Zellen vermutlich neben den mutierten Allelen auch noch das geflochte Allel exprimiert wird. Dabei darf aber nicht vernachlässigt werden, dass in Lymphknoten neben T-Zellen auch andere Zellen, wie z.B. B-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen und Granulozyten vorkommen, in denen aufgrund der Verwendung der T-Zell-spezifischen CD4-Cre-Rekombinase keine Deletion vorliegen kann. Somit liegt die Vermutung nahe, dass auch in den peripheren T-Zellen aus Lymphknoten bei den Mutanten ebenfalls eine Deletion vorliegt, wenn die T-Zellreifung im Thymus nicht beeinträchtigt ist.

Durch eine Westernblot-Analyse konnten Rückschlüsse auf die Expression der mutierten Proteine gezogen werden. Bei der Analyse wurde ein Antikörper verwendet, der das Cofilin1-Ala- und das Cofilin1-Asp-Protein gleich gut detektieren kann (Beobachtungen AG Witke). Sowohl das Cofilin1-Ala- als auch das Cofilin1-Asp-Protein scheint in Thymozyten sowie in Zellen aus Lymphknoten exprimiert zu werden. Die T-Zellen der Mutanten (Cof1<sup>fl/Ala</sup>:CD4-Cre bzw. Cof1<sup>fl/Asp</sup>:CD4-Cre) exprimieren erwartungsgemäß mehr Protein als die Cofilin1-KO-Zellen (Cof1<sup>fl/fl</sup>:CD4-Cre), aber weniger Cofilin1-Protein als die Kontrollen mit einem geflochten und einem mutierten Cofilin1-Allel (Cof1<sup>fl/Ala</sup>, Cof1<sup>fl/Asp</sup>), da in den Mutanten-Zellen die Deletion auf nur einem Allel erfolgt.

Im Folgenden wurde die Bedeutung des Aktivierungsstatus von Cofilin1 für eine erfolgreiche Reifung von T-Zellen im Thymus untersucht. Die durchflusszytometrische Untersuchung von Thymozyten mit Hilfe der Marker für die Co-Rezeptoren CD4 und CD8 zeigt, dass in der Mutante mit konstitutiv aktivem Cofilin1 eine normale T-Zell-Reifung erfolgt, die über das DN- zum DP-Stadium verläuft und hin zu reifen T-Zellen führt, die letztendlich in das periphere lymphatische System emigrieren können. Die Thymozyten mit einem konstitutiv inaktiven Cofilin1 verharren dagegen im DP-Stadium und bilden, wie die Cofilin1-KO-Mutante, keine einfach positiven T-Zellen aus. Wie bereits die *in vitro*-Untersuchungen gezeigt haben, ist das Cofilin1-Asp-Protein bezüglich seiner Bindung und Aktivität gegenüber Aktin nahezu inaktiv (siehe Abschnitt 5.1), sodass der beobachtete Phänotyp offensichtlich ist. Diese Untersuchungen machen deutlich, dass für die erfolgreiche Reifung der T-Zellen im Thymus aktiviertes, nicht phosphoryliertes Cofilin1 essentiell ist. Es ist bekannt, dass der Cofilin1-KO in Thymozyten einen Einfluss auf Adhäsion und Migration dieser Zellen nimmt und so zu einer Blockade in der T-Zellreifung führt (persönliche Mitteilung, Andrée Salz). Daher liegt der Schluss nahe, dass für diese Prozesse Cofilin1 in seiner aktiven Form benötigt wird.

Die Blockade in der T-Zellreifung bei konstitutiv aktivem Cofilin1 macht rückwirkend deutlich, dass das Cofilin1-Signal der analysierten lymphatischen Zellen dieser Mutante in Southern- und Westernblot nicht auf T-Zellen, sondern auf andere Zellen zurückzuführen sein muss.

Es konnte gezeigt werden, dass durch konstitutiv aktives Cofilin1 der Anteil von T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) in Lymphknoten, Milz und Blut nahezu unverändert ist. Trotzdem stellt sich die Frage, ob diese Zellen zwar vorhanden, aber dennoch eine funktionale Beeinträchtigung besitzen, da durch ein konstitutiv aktives Cofilin1 keine gezielte Regulation der Dynamik des Aktinzytoskeletts durch dieses Protein gegeben sein kann. Aufgrund einer anhaltenden depolymerisierenden Aktivität des Cofilin1-Proteins könnte der F-Aktin-Level in diesen Zellen verändert sein. Aktinstatusanalysen mit Markern für G- (DNaseI) und F-Aktin (Phalloidin) machen deutlich, dass in allen analysierten Zellen mit Cofilin1-Ala-Protein ein erhöhter F-Aktin-Level gegenüber den Kontrollzellen (CD4-Cre) vorliegt. Dies stimmt mit den Beobachtungen aus den *in vitro*-Studien überein (siehe Abschnitt 5.1), das konstitutiv aktive Cofilin1 die Aktinpolymerisation stärker begünstigt als das Cofilin1-WT-Protein, was sehr wahrscheinlich auf eine erhöhte Aktindynamik

zurückzuführen ist. Allerdings sei hier angemerkt, dass auch das Fehlen eines Cofilin1-Allels (Cofilin1<sup>fl/del</sup>) sehr wahrscheinlich zu einer Erhöhung des F-Aktinlevels in T-Zellen führt (Beobachtungen AG Witke). Da man mit der hier angewendeten Southernblot-Analyse auf DNA-Ebene nicht zwischen einem deletierten und einem mutierten Cofilin1-Allel differenzieren kann, wäre für weitere Untersuchung des Aktinstatus auch das Einbeziehen von T-Zellen des Genotyps Cof1<sup>fl/del</sup> und Cof1<sup>fl/+</sup>:CD4-Cre wichtig, um zwischen einem Effekt des mutierten und des deletierten Cofilin1-Alles unterscheiden zu können.

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass für die T-Zellreifung im Thymus aktives Cofilin1-Ala-Protein essentiell ist. Inaktives Cofilin1-Asp-Protein führt dagegen, ebenso wie der vollständige KO von Cofilin1 mittels der CD4-Cre-Rekombinase, zu einer Blockade in der T-Zellentwicklung im Thymus. Sowohl T-Helferzellen als auch zytotoxische T-Zellen mit konstitutiv aktivem Cofilin1 reifen im Thymus heran und migrieren in das periphere lymphatische System. Um die Frage nach einer eventuellen Beeinträchtigung von T-Zellen mit konstitutiv aktivem Cofilin1 eingehender zu beantworten, könnte in weiterführenden Untersuchungen die Funktionalität, beispielsweise hinsichtlich der Aktivierbarkeit, gezielt analysiert werden. *In vitro*-Untersuchungen mit Jurkat- und Molt-4-Zellen aus malignen T-Zelllymphomen belegen, dass es durch die spontane Aktivierung von Cofilin1 zu einer nuklearen Translokation kommt (SAMSTAG et al., 1994; SAMSTAG et al., 1996) (Samstaget al.,ÇSamstaget al.,ÇÇ. Dies führt zu der Vermutung, das konstitutiv aktives Cofilin1 eine Rolle bei diesen Krankheiten zukommt.

### **5.2.2. Hat das Ausschalten von Cofilin1 in einer späten Phase der T-Zellreifung einen Einfluss auf die Entwicklung von T-Zellen?**

Das Ausschalten von Cofilin1 in einer frühen Phase der T-Zellentwicklung im Thymus während des DN3-Stadiums führt zu einer vollständigen Blockade bei der Reifung einfach positiver Thymozyten, sodass keine reifen T-Zellen erhalten werden, die in die peripheren lymphatischen Organe auswandern können (SALZ, 2011). Um dennoch die Bedeutung von Cofilin1 in peripheren T-Zellen näher untersuchen zu können, wurde im Zuge dieser Arbeit die dLck-Cre-Rekombinase verwendet, die erst in einer späten Phase der T-Zellreifung, im Anschluss an die positive Selektion, aktiv ist. Es stellt sich die Frage, ob Thymozyten mit einer Deletion vermittelt durch diese Rekombinase eine normale Entwicklung durchlaufen.

Die durchflusszytometrische Untersuchung mittels der Marker für CD4 und CD8 zeigen, dass sich die Thymozytenentwicklung der Mutante ( $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}:\text{dLck-Cre}$ ) von der Kontrolle ( $\text{dLck-Cre}$ ) nicht unterscheidet. Die Thymozyten durchlaufen eine Reifung von doppelt negativen hin zu doppelt positiven Zellen, die sich dann zu einfach positiven Zellen entwickeln. Zwischen dem Anteil CD4- als auch CD8-einfach positiver Thymozyten von Mutante im Vergleich zur Kontrolle besteht kein signifikanter Unterschied.

Um sowohl auf DNA- als auch auf Protein-Ebene in CD4- und CD8-einfach positiven Thymozyten eine Deletion des Cofilin1-Gens bzw. eine Abnahme des Cofilin1-Proteins vermittelt durch die  $\text{dLck-Cre}$ -Rekombinase nachzuweisen, wurden mit Hilfe der MACS-Zellseparation einfach positive Thymozyten isoliert. Die Analyse wurde mit CD4- und CD8-einfach positiven Thymozyten durchgeführt, weil erst in diesen die  $\text{dLck-Cre}$ -Rekombinase aktiv ist. Die Deletion wurde sowohl in Zellen untersucht, die zwei gefloxt Cofilin1-Allele enthielten ( $\text{Cof1}^{\text{fl/fl}}:\text{dLck-Cre}$ ) als auch in Zellen mit einem gefloxt und einem deletierten Cofilin1-Allel ( $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}:\text{dLck-Cre}$ ). In der Southernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass bei beiden Genotypen in den CD4-einfach positiven Thymozyten nur eine schwache Deletion vorliegt, während in CD8-Thymozyten eine effiziente Rekombination des Cofilin1-Allels nachweisbar ist. Diese differentielle Deletionseffizienz konnte bereits in den Untersuchungen mit den Rosy-Reportermäusen gezeigt werden (siehe Abschnitt 5.2). Die Beobachtungen bestätigen, dass die verstärkte Rekombination in den CD8-einfach positiven Zellen nicht auf den genetischen Locus, sondern auf die Expression der  $\text{dLck-Cre}$ -Rekombinase zurückzuführen ist, wie bereits in der Literatur zu dieser Mauslinie beschrieben (ZHANG et al., 2005). Die Ergebnisse des Westernblots zeigen dagegen, dass auf Protein-Ebene sowohl in CD4- als auch in CD8-positiven Thymozyten die Abnahme des Cofilin1-Proteins nicht sehr stark ausgeprägt ist. Dies lässt sich einerseits damit erklären, dass das Cofilin1-Protein eine große Halbwertszeit besitzt (siehe Abschnitt 5.1; 5.3) und es somit erst über die Zeit verschwindet. In T-Zellen des peripheren lymphatischen Systems konnte eine deutlich verringerte Proteinmenge nach  $\text{dLck-Cre}$ -spezifischer Cofilin1-Deletion gezeigt werden (vgl. Abschnitt 4.3.4.2), worauf im folgenden Abschnitt eingegangen wird. Andererseits wird die Deletion und die Abnahme des Proteins vermutlich nicht in allen Zellen gleichzeitig ablaufen, sodass der Cofilin1-Protein-Level zu diesem Zeitpunkt von Zelle zu Zelle variiert.



Während der T-Zellentwicklung im Thymus sind die Thymozyten durch die Expression verschiedener Oberflächenproteine gekennzeichnet. Die  $\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors wird ab einer späten Phase des doppelt positiven Stadiums kurz vor der positiven Selektion und von diesem Zeitpunkt an stark exprimiert (ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2004). Die Expression des Oberflächenmarkers CD24 beginnt ab einer frühen Phase des doppelt positiven Stadiums der T-Zellreifung (CRISPE, BEVAN, 1987) und wird wieder herunter reguliert, wenn die T-Zellen aus dem Thymus in das periphere lymphatische System emigrieren (FINK, HENDRICKS, 2011). Die CD69-Expression beginnt mit der positiven Selektion und hält dann an (YAMASHITA et al., 1993). Die drei Marker TCR $\beta$ , CD24 und CD69 werden somit annähernd alle kurz vor dem Schlüsselereignis der positiven Selektion exprimiert und die Expression dann reguliert. Die dLck-Cre-Rekombinase zeigt ihre Aktivität kurz nach diesem Ereignis, sodass die Analyse dieser Marker dazu genutzt werden kann, Auswirkungen hervorgerufen durch die Cofilin1-Deletion, aufzudecken. Die Analyse zeigt wiederum, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutante (Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre) und Kontrolle (dLck-Cre) zu keinem der drei Reifungsstadien (doppelt negativ, doppelt positiv, einfach positiv) besteht.

Während der Thymozytenreifung durchlaufen diese Zellen Phasen der Selektion, die sicherstellen, dass nur T-Zellen in die peripheren lymphatischen Organe auswandern, die sowohl körpereigene MHC-Moleküle als auch körperfremde Antigene erkennen können. Aufgrund dieser Selektionsschritte kommt es zu einem erhöhten Auftreten von Apoptose. (MURPHY et al., 2014) Eine weitere Erhöhung des programmierten Zelltods durch die dLck-Cre-Rekombinase vermittelte Cofilin1-Deletion konnte in Thymozyten nach durchflusszytometrischer Untersuchung mit Hilfe des Apoptose-Markers AnnexinV nicht nachgewiesen werden. AnnexinV ist ein Phospholipid-Bindeprotein, welches eine hohe Affinität für Phosphatidylserin hat. Dieses Membranphospholipid wird bei Apoptose von der Innen- auf die Außenseite der Membran transloziert und kann somit über AnnexinV als Marker nachgewiesen werden (VERMES et al., 1995).

Während der verschiedenen Stadien der T-Zellreifung migrieren die Thymozyten durch den Thymus (COWAN et al., 2015). Da die Dynamik des Aktinzytoskeletts eine bedeutende Rolle bei der Migration von Zellen spielt (LAMBRECHTS et al., 2004) und Cofilin1 eine entscheidende Funktion dabei zukommt, wurde der G- und F-Aktinlevel in der Mutante (Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre) im Vergleich zur Kontrolle (dLck-Cre) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in einfach positiven Thymozyten der Mutante der F-Aktinlevel deutlich erhöht ist, während der G-

Aktinlevel minimal erniedrigt ist. Dies ist insbesondere in den CD8-einfach positiven Thymozyten noch stärker ausgeprägt als in den CD4-Thymozyten, was sehr wahrscheinlich wieder auf die differentielle Expression der Rekombinase in den jeweiligen Zelltypen zurückzuführen ist (vgl. Abschnitt 5.2). Die Erhöhung des F-Aktinlevels in diesen Zellen mit erniedrigter Cofilin1-Expression ist näherungsweise um den Faktor 1,3 stärker als in den einfach positiven Thymozyten mit konstitutiv aktivem Cofilin1-Ala-Protein. Während das konstitutiv aktive Cofilin1 offenbar durch seine Aktivität gegenüber Aktin zu einer verstärkten Aktinpolymerisation und damit zu einer Erhöhung des F-Aktinlevels führt, bewirkt das Fehlen von Cofilin1, dass die Filamente nicht mehr abgebaut werden, sodass womöglich die Dynamik dieser verloren geht. Es stellt sich die Frage, ob dies eine Auswirkung auf die Migration dieser Zellen bei der Emigration aus dem Thymus oder später im peripheren lymphatischen System hat.

Die T-Zellen, die erfolgreich im Thymus herangereift sind und alle Selektionsschritte durchlaufen haben, lassen sich an ihrem Expressionsprofil für die Marker CD24 und Qa2 identifizieren. Bei diesen Zellen wird die CD24-Expression wieder herunterreguliert, wenn die T-Zellen den Thymus verlassen haben, während die Expression des Markers Qa2 hochreguliert wird. Man bezeichnet diese Zellen als *Recent Thymic Emigrants*. (FINK, HENDRICKS, 2011; FINK, 2013)

Die Analyse der Zellen, die kurz vor der Emigration aus dem Thymus stehen, die *pre-Recent Thymic Emigrants (pre-RTEs)*, mit dLck-Cre-vermittelter Cofilin1-Deletion zeigen eine erhöhte CD24-Expression, exprimieren aber weniger Qa2. Diese Tendenz ist erwartungsgemäß in CD8-einfach positiven Zellen stärker als in CD4-positiven. Die Mutante besitzt demnach mehr *pre-RTEs* (CD24<sup>hi</sup>Qa2<sup>-</sup>), aber weniger Zellen, die sich zu reifen naiven T-Zellen entwickeln als die Kontrolle. Damit wird die Beobachtung bestätigt, dass sich Thymozyten mit einer Cofilin1-Deletion einerseits normal im Thymus entwickeln können und sogar mehr dieser reifen Thymozyten vorhanden sind. Andererseits aber wiederum der finale Reifungsschritt von *pre-RTEs* zu letztendlich reifen, naiven T-Zellen, der hier nur in Ansätzen beurteilt werden kann, weil er überwiegend im peripheren lymphatischen System stattfindet, beeinträchtigt ist.

Dass dennoch der Anteil der CD4- und CD8-einfach positiven Thymozyten an den Gesamtzellen im Thymus bei der Mutante gegenüber der Kontrolle unbeeinflusst ist, lässt sich damit erklären, dass der Anteil der einen Subpopulation (CD24<sup>hi</sup>Qa2<sup>-</sup>↑) zwar erhöht,

der beiden anderen ( $CD24^{int}QA2^{+} \downarrow$ ,  $CD24^{-}QA2^{+} \downarrow$ ) aber erniedrigt ist, sodass es zu einer Kompensation kommt.

Der erhöhte F-Aktinlevel als auch das vermehrte Vorhandensein von *preRTes* können einen Hinweis darauf liefern, dass diese Zellen eventuell in ihrer Migration beeinträchtigt sind. Zellmigration ist sehr entscheidend bei der Emigration naiver T-Zellen aus dem Thymus und für das *Homing* in die peripheren lymphatischen Organe (CYSTER, 2005). Können T-Zellen mit Cofilin1-Deletion erfolgreich den Thymus verlassen und in das periphere lymphatische System einwandern?

### 5.2.3. Welche Rolle spielt Cofilin1 für reife T-Zellen im peripheren lymphatischen System?

Die durchflusszytometrische Untersuchung des Anteils von T-Helferzellen ( $CD4^{+}$ ) und zytotoxischen T-Zellen ( $CD8^{+}$ ) in den sekundären lymphatischen Organen, Lymphknoten, Milz und Blut, in Mäusen mit dLck-Cre-vermittelter Cofilin1-Deletion ( $Cof1^{fl/del};dLck-Cre$ ) zeigt eine signifikante Reduktion dieser Zellen gegenüber den Kontrolltieren ( $dLck-Cre$ ) in diesen Organen. Dieser Effekt ist für die  $CD8^{+}$ -T-Zellen mit höherer dLck-Cre-Rekombinase-Aktivität am deutlichsten ausgeprägt und insgesamt für beide Zelltypen im Blut am stärksten. Dies bestätigt die Vermutung, dass Cofilin1-defiziente T-Zellen offenbar überwiegend so beeinträchtigt sind, dass sie nach einer erfolgreichen Reifung im Thymus nicht ihren Bestimmungsort im peripheren lymphatischen System erreichen. Sakata et al. konnten zeigen, dass der KO von mDia1 in der Maus zu einem vergleichbaren Phänotyp führt. Das Protein mDia1, ein Formin, ist auch ein Aktin bindendes Protein, welches zu den Nukleationsfaktoren zählt und die Bildung von Aktinkeimen und weiterhin auch die Elongation von Aktinfilamenten fördert.  $mDia1^{-/-}$ -Thymozyten reifen ebenfalls normal im Thymus heran, zeigen dann aber auch einen *Homing*-Defekt in die sekundären lymphatischen Organe. Es konnte eine gestörte Migration der mDia1-KO-Thymozyten hin zu den Chemokinen CXCL12 und CCL21 gezeigt werden. Diese beiden Chemokine spielen eine Rolle beim Auswandern der Zellen in das periphere lymphatische System (STEIN, NOMBELA-ARRIETA, 2005). Darüber hinaus zeigen  $mDia1^{-/-}$ -T-Zellen eine beeinträchtigte Adhäsion. (SAKATA et al., 2007) Weiterhin konnten Faroudi et al. zeigen, dass auch eine Deletion der Rac-GTPase in Mäusen aufgrund von Migrations- und Adhäsionsdefekten der T-Zellen zu einem Fehlen dieser im peripheren lymphatischen System führt (FAROUDI et al., 2010). Aus anderen

Studien ist wiederum bekannt, dass die Ras-GTPase, die, wie die Rac-GTPase, ebenfalls der Ras-Superfamilie angehört, ein zentraler Regulator des Signalwegs zur Aktivierung von Cofilin1 darstellt (NEBL et al., 2004). Der Ras-MEK/PI3K-Signalweg führt zur Cofilin1-Aktivierung und ist essentiell für die T-Zellmigration (KLEMKE et al., 2010). Zusammengenommen könnte man aus diesen Hinweisen schließen, dass auch das Fehlen von T-Helferzellen und von zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion ebenfalls auf einen Defekt bezüglich Migration und Adhäsion der Zellen zurückzuführen ist, da diesen Zellen ein bedeutender Modulator des Aktinzytoskeletts fehlt, und somit ein Großteil der Thymozyten nicht aus dem Thymus emigriert. Migrations- und Adhäsionsdefekte sind auch der Grund dafür, weshalb Thymozyten mit einer frühen Cofilin1-Deletion bezüglich der T-Zellentwicklung eine Blockade bei der Reifung zeigen (persönliche Mitteilung, Andrée Salz). Durch Westernblot-Analysen mit aufgereinigten T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen von  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}:\text{dLck-Cre}$ -Mäusen konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen, die das periphere lymphatische System erreichen, eine Verminderung des Cofilin1-Proteins zeigen. Während in den CD4-positiven T-Zellen aufgrund der differentiellen Expression der dLck-Cre-Rekombinase in diesen Zellen nur eine geringe Cofilin1-Reduktion vorliegt, ist diese aber wiederum in den CD8-positiven T-Zellen sehr stark. Die zytotoxischen T-Zellen der Mutante weisen im Vergleich zur Kontrolle ( $\text{Cof1}^{\text{fl/fl}}$ ) nur noch 20 % Cofilin1-Protein auf. Diese kleine Anzahl von Zellen, die bei der Mutante die Milz als repräsentatives sekundäres lymphatisches Organ erreicht, weist demnach, insbesondere in den zytotoxischen T-Zellen, eine Reduktion des Cofilin1-Proteins auf. Diese Zellen sind offensichtlich in der Lage das Fehlen des Cofilin1-Proteins zu kompensieren. Allerdings weisen sie ein erhöhtes Vorkommen von Apoptose auf. Durch die durchflusszytometrische Untersuchung des Apoptose-Markers AnnexinV von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen aus Lymphknoten und Milz von Cofilin1-defizienten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass bei der Mutante ( $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}:\text{dLck-Cre}$ ) im Vergleich zur Kontrolle (dLck-Cre) eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen vorliegt. Auch eine Blockade einer Serin-Phosphatase, die in der Regel Cofilin1 aktiviert, führt in Jurkat-Zellen zu einer Erhöhung der Apoptose (SAMSTAG et al., 1996). Dass in den peripheren T-Zellen im Vergleich zu den Thymozyten der  $\text{Cof1}^{\text{fl/del}}:\text{dLck-Cre}$ -Mäuse die Apoptose erhöht ist, ist darauf zurückzuführen, dass die Reduktion des Cofilin1-Proteins in diesen Zellen deutlich stärker ist.

In T-Zellen aus allen drei peripheren lymphatischen Organen der Cofilin1-Deletionsmutante konnte durchflusszytometrisch ein stark erhöhter F-Aktinlevel nachgewiesen werden, während der G-Aktinlevel kaum beeinflusst ist. Dies zeigt sich erwartungsgemäß aufgrund der differentiellen dLck-Cre-Rekombinase-Expression in den zytotoxischen T-Zellen stärker als in den T-Helferzellen. Es könnte wiederum ein Hinweis darauf sein, dass auch die Cofilin1-defizienten T-Zellen, die erfolgreich aus dem Thymus emigrieren und in die sekundären lymphatischen Organe einwandern, ebenfalls einen Defekt hinsichtlich der Migration und Adhäsion aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Cofilin1-Deletion in einer späten Phase der T-Zellentwicklung dazu führt, dass die Thymozyten vermutlich aufgrund von Migrations- und Adhäsionsdefekten überwiegend nicht aus dem Thymus emigrieren und in das periphere lymphatische System auswandern können. Der geringe Anteil reifer T-Zellen, der trotz eines Fehlens des Cofilin1-Proteins die sekundären lymphatischen Organe erreicht, weist eine erhöhte Apoptose und vermutlich ebenfalls Migrations- und Adhäsionsdefekte auf.

Weiterführende Untersuchungen könnten einen näheren Aufschluss über diese möglichen Defekte von Cofilin1-defizienten Thymozyten und T-Zellen liefern. Die Migration kann in einem sogenannten *Transwell*-Assay analysiert werden. Das Prinzip dieses Assays besteht darin, dass die zu untersuchenden Zellen auf eine zellpermeable Membran gegeben werden. Unter dieser Membran befindet sich ein Medium, welches beispielsweise Chemokine beinhaltet. Die Zellen müssen aktiv durch die Membran migrieren und können dann mikroskopisch nachgewiesen werden. Alternativ zu diesem Assay kann die Migration auch in einer Collagen-Matrix analysiert werden. Die Adhäsion der Zellen kann überprüft werden, indem beispielsweise das Oberflächenprotein ICAM-1 an ein Substrat immobilisiert und die Zelladhäsion daran mikroskopisch analysiert wird. ICAM-1 wird von Zellen des Immunsystems und Endothelzellen exprimiert, vom LFA-Antigen der T-Zellen erkannt und spielt beim T-Zell-*Homing* eine Rolle (MURPHY et al., 2014).

Eine begleitende Beobachtung des Fehlens von T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen, ist eine Erhöhung des B-Zellanteils. Dies konnte mittels durchflusszytometrischer Untersuchung des T-Zellmarkers CD3ε und des B-Zellmarkers CD19 nachgewiesen werden. Die B-Zellen scheinen damit eine Art Ausgleich für die reduzierte T-Zellanzahl zu schaffen.

### 5.2.4. Hat der Cofilin1-KO in zytotoxischen T-Zellen einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit dieser Zellen?

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die durch die dLck-Cre-Rekombinase vermittelte Cofilin1-Deletion in zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) am stärksten ist, was auf die verstärkte Aktivität der Rekombinase in diesen Zellen zurückzuführen ist (ZHANG et al., 2005). Es stellt sich die Frage, ob sich Cofilin1-defiziente zytotoxische T-Zellen weiterhin normal aktivieren lassen, sodass sie ihrer Aufgabe bei der spezifischen Immunantwort nachkommen können. Eibert et al. konnten mit humanen PBTs zeigen, dass die T-Zellaktivierung über den T-Zellrezeptorkomplex und die gleichzeitige Stimulation der Co-Rezeptoren CD2 oder CD28 nur zu einer Aktivierung der T-Zellen führt, wenn auch Cofilin1 aktiv ist. Wird dagegen die Aktinbindung von Cofilin1 blockiert, kommt es zu einer deutlichen Reduktion des Wachstumsfaktors Interleukin-2. (EIBERT et al., 2004) Die Ausschüttung von IL-2 ist ein Hinweis auf die Aktivierung von T-Zellen (SMITH, 1988).

Für die Analysen wurden zytotoxische T-Zellen mit Hilfe der MACS-Zellseparation aus der Milz von Mutanten- (Cof1<sup>fl/del</sup>:dLck-Cre) und Kontrolltieren (dLck-Cre) gewonnen, über einen Zeitraum von fünf Tagen in Kultur genommen und permanent die beiden Rezeptoren CD3 und CD28 stimuliert. Diese Stimulation führt zur Aktivierung naiver T-Zellen (FRAUWIRTH, THOMPSON, 2002) und äußert sich durch Proliferation, Expression bestimmter Aktivierungsmarker, Ausschüttung von Cytokinen und Synthese neuer Proteine (MURPHY et al., 2014).

Die Untersuchung der zytotoxischen T-Zellen mit Cofilin1-Deletion direkt nach der Isolation aus der Maus zeigten eine stark erhöhte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67. Dieser Marker wird in allen teilungsaktiven Zellen exprimiert, nicht aber in ruhenden Zellen (SCHOLZEN, GERDES, 2000). Hingegen proliferieren die Cofilin1-deletierten T-Zellen über die Zeit in Kultur nur kaum und sterben deutlich schneller als die Kontrollzellen, was Zellzahlanalysen bestätigen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass in T-Zellen ohne Cofilin1-Protein, die Apoptose erhöht ist (vgl. Abschnitt 5.2.3). Auch die Analyse der Interleukin-2-Ausschüttung mittels ELISA korreliert mit den Beobachtungen. Zu Beginn der Aktivierung der Cofilin1-defizienten Zellen schütten diese minimal mehr IL-2 aus als die Kontrollzellen und dann kehrt sich das Verhältnis um, sodass die Mutante weniger IL-2 sekretiert. Die Studien an mDia<sup>-/-</sup>-T-Zellen zeigen ebenfalls einen Proliferationsdefekt (SAKATA et al., 2007). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass durch das Fehlen von Cofilin1 die T-Zellen

einerseits hyperaktiv hinsichtlich Proliferation sind, aber dass eine T-Zellaktivierung zum Absterben der Zellen führt, weil sie durch das Fehlen des Aktinmodulators Cofilin1 nicht entsprechend reagieren können.

Die durchflusszytometrische Analyse der beiden frühen Aktivierungsmarker CD25 und CD69, die kurz nach der Antigenbindung an den T-Zellrezeptor exprimiert werden (SHIPKOVA, WIELAND, 2012), wirft ein zweigeteiltes Bild auf. Die CD69-Expression ist bei den Zellen der Mutante im Vergleich zur Kontrolle reduziert, während die CD25-Expression sogar schon bei den unstimulierten Zellen stärker ist und auch nach Aktivierung stärker exprimiert bleibt. Die verminderte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 korreliert mit der verminderten Proliferation und Interleukin-2-Sekretion der Zellen. Gleichzeitig passt die erhöhte CD25-Expression zur starken Expression von Ki-67. Dies lässt darauf schließen, dass beide Aktivierungsmarker auf unterschiedlichen Ebenen reguliert werden.

Die beiden Zelladhäsionsmoleküle CD62L und CD44 geben ebenfalls Aufschluss über den Aktivierungszustand einer Zelle und werden auch als *Homing*-Rezeptoren bezeichnet (BUTCHER, PICKER, 1996). Während die Expression von CD62L für ein Verbleiben der T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen sorgt, bewirkt die CD44-Expression dagegen das Einwandern der T-Zellen ins Gewebe. Eine starke Expression von CD62L und eine minimale Expression von CD44 zeichnen demnach eine naive T-Zelle ( $CD44^-CD62L^+$ ) aus, während zentrale Gedächtniszellen ( $CD44^+CD62L^+$ ) und Effektorgedächtniszellen ( $CD44^+CD62L^-$ ) CD44 exprimieren. Nach Aktivierung naiver T-Zellen werden zentrale Gedächtnis- und Effektorgedächtniszellen gebildet. Es konnte durchflusszytometrisch gezeigt werden, dass man in der Mutante sehr wenige naive T-Zellen, dafür aber ein erhöhtes Vorkommen an zentralen Gedächtnis- und Effektorgedächtniszellen findet.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse darauf schließend, dass ein Fehlen von Cofilin1 in zytotoxischen T-Zellen zu permanenter Aktivität dieser Zellen führt, was sich durch die starke Expression des Proliferationsmarker Ki-67, der Expression des Aktivierungsmarkers CD25 und dem vermehrten Vorhandensein von Gedächtniszellen äußert. Demgegenüber sind diese Zellen aber nicht mehr durch CD3 und CD28 aktivierbar, was sich in einer verminderten Proliferation, einer reduzierten IL-2-Sekretion und einer reduzierten CD69-Expression zeigt. Cofilin1 ist maßgeblich an der Bildung der immunologischen Synapse beteiligt (EIBERT et al., 2004). Vielleicht ist durch den Cofilin1-KO die Bildung dieser Synapse beeinträchtigt, da die

Dynamik des Aktinzytoskeletts nicht mehr gegeben ist und somit beispielsweise die Rekrutierung und Formierung von Signalkomplexen nicht mehr korrekt ablaufen kann.

Zur Klärung dieser Frage könnte in weiterführenden Untersuchungen die Bildung der immunologischen Synapse zwischen zytotoxischen Cofilin1-KO-T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen eingehend untersucht werden. Dazu wäre die Verpaarung mit einer OT1-Maus sinnvoll. Bei dieser Mauslinie exprimieren die CD8-positiven T-Zellen einen T-Zellrezeptor, der sich ausschließlich durch eine bestimmte Peptidabfolge des Ovalbumin-Proteins aktivieren lässt (CLARKE et al., 2000). Unter Verwendung dieser Mauslinie wäre eine gezielte Aktivierung dieser Zellen möglich.

### 5.3. Die Halbwertszeit von Cofilin1 in peripheren T-Zellen *in vitro*

Wie bereits in Abschnitt 5.2.3 beschrieben, führt die Deletion von Cofilin1 mittels der dLck-Cre-Rekombinase in T-Zellen *in vivo* zu einer Reduktion dieser Zellen im peripheren lymphatischen System. Um diese Problematik zu umgehen, wurden im Zuge dieser Arbeit Bedingungen etabliert, die eine Cofilin1-Deletion in primären T-Zellen in Kultur ermöglichen. Dazu wurde die Tamoxifen-induzierbare CreER<sup>T2</sup>-Cre-Rekombinase verwendet, die unter der Kontrolle des ubiquitären ROSA26-Promotors steht, sodass die Rekombinase nach Induktion in allen Geweben exprimiert wird (BADEA et al., 2003). Zur Etablierung der Bedingungen zur Tamoxifen-induzierbaren CreER<sup>T2</sup>-Rekombinase in T-Zellen wurde die Rosy-Reportermaus verwendet. Diese Mauslinie trägt stromabwärts des ROSA26-Promotors eine durch loxP-Stellen flankierte Stopp-Kassette gefolgt von dem eYFP-Reportergen, sodass nach erfolgreicher Rekombination dieses Protein exprimiert wird und durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann (SRINIVAS et al., 2001). Die Vorversuche wurden an T-Zellen aus Lymphknoten und Milz von Rosy:CreER<sup>T2</sup>-Mäusen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der T-Zellen mit 1 µM Tamoxifen in Kultur dazu führt, dass nach einem Zeitraum von sechs Tagen annähernd jede T-Zelle das YFP-Reporterprotein exprimiert.

Anschließend wurden die in den Vorversuchen ermittelten Bedingungen auf den Cofilin1-Genlocus übertragen und somit die darauffolgenden Versuche mit T-Zellen aus Mäusen mit dem Genotyp Cof1<sup>fl/fl</sup>:CreER<sup>T2</sup> durchgeführt. Mit einer Southernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Deletion des Cofilin1-Gens nach einem Zeitraum von vier Tagen Tamoxifen-Behandlung sowohl in T-Zellen aus Lymphknoten als auch aus Milz nahezu vollständig erfolgt. Die Westernblot-Analyse dieser Zellen macht dagegen deutlich, dass auf



Proteinebene Cofilin1 noch vorhanden ist. Dies lässt darauf schließen, dass das Cofilin1-Protein, wie bereits in Abschnitt 5 beschrieben, eine große Halbwertszeit besitzt und noch Protein nachweisbar ist, obwohl das Gen erfolgreich deletiert wurde. Diese große Halbwertszeit des Cofilin1-Proteins in T-Zellen, die im Bereich von Tagen liegt, konnte im Zuge der Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden. Im Vergleich zu anderen Proteinen liegt die Halbwertszeit von Cofilin1 im oberen Bereich (MAIER et al., 2009). Die LIM-Kinase 1, welche Cofilin durch Phosphorylierung aktiviert, hat mit ca. 20 h ebenfalls eine große Halbwertszeit (LI et al., 2006). Die Halbwertszeit von Connexinen, Transmembranproteinen, die in der Zelle Gap Junctions ausbilden, haben dagegen mit zu 5 h eine relativ kurze Halbwertszeit (FALLON, GOODENOUGH, 1981). Die Halbwertszeiten von Proteinen können zwischen einigen Sekunden bis hin zu Tagen variieren (MAIER et al., 2009).

## 5.4. Das Cofilin1-Aptamer

Nachdem im vorangegangenen Teil der Arbeit versucht wurde, das Cofilin1-Protein mittels molekulargenetischer Methoden durch den Einsatz verschiedener Mausmodelle auszuschalten, wurde in diesem Teil die Aptamer-Technologie zur spezifischen Regulation der Cofilin1-Aktivität angewendet. Aptamere sind kurze Nukleotide, die über ihre jeweilige charakteristische, dreidimensionale Faltung mit hoher Affinität und Spezifität an ihr Zielprotein binden (STOLTENBURG et al., 2007) und dessen Funktion regulieren können (FAMULOK et al., 2001). Durch die Bindung eines Aptamers an das Cofilin1-Protein könnte vielleicht das Aktinbindemotiv (ADF-H) blockiert werden, sodass Cofilin1 nicht mehr in der Lage ist an Aktin zu binden. Eine andere Inhibierung von Cofilin1 durch ein Aptamer könnte beispielsweise so erfolgen, dass die Bindung einer Cofilin1 aktivierenden Phosphatase aus sterischen Gründen nicht mehr möglich ist und das Cofilin1-Protein somit permanent inaktiv wäre.

Die Selektion eines RNA-Aptamers gegen das Cofilin1-Protein erfolgte mit Hilfe des SELEX-Verfahrens (vgl. Abschnitt 1.3.2). Dabei wurde Cofilin1 mit einem C-terminalen Strep-Tag versehen, um es affinitätschromatographisch aufzureinigen und für die Selektion an magnetische *Beads* immobilisieren zu können. Nach 10 SELEX-Zyklen wurden einzelne SELEX-Runden auf die Anreicherung bindender Sequenzen mittels Filterbindung untersucht. Dabei wurden die selektierten Oligonukleotide bei der Transkription radioaktiv markiert und ihre Bindung an aufsteigende Konzentrationen des Cofilin1-Proteins analysiert. Das Prinzip dieses

Assays besteht darin, dass das Protein von einer Nitrocellulosemembran zurückgehalten wird und die radioaktiv markierten Sequenzen bei erfolgter Bindung an das Protein nachgewiesen werden können. Im Filterbindungsassay konnte gezeigt werden, dass die 10. SELEX-Runde bindende Sequenzen aufweist und dass die Anreicherung dieser Sequenzen in Runde 7 begonnen hat.

Bindungsstudien einzelner Sequenzen dieser beiden SELEX-Runden brachten eine einzige Sequenz hervor, die an das Zielprotein Cofilin1 bindet. Im Filterbindungsassay konnte gezeigt werden, dass die gefundene Sequenz einen  $K_D$ -Wert von 255,4 nM für das Cofilin1-Protein besitzt, welcher laut Erfahrungen der AG Mayer im erwarteten Bereich liegt. Die Affinitäten eines Aptamers sind vergleichbar mit denen von Antikörpern. Die meisten  $K_D$ -Werte von Aptameren liegen im nanomolaren bis pikomolaren Bereich. (STOLTENBURG et al., 2007)

Die Untersuchungen zur Spezifität des potentiellen Cofilin1-Aptamers, ebenfalls über einen Filterbindungsassay, stellten heraus, dass die gefundene Sequenz auch eine Affinität zu einem weiteren Mitglied der ADF/Cofilin-Proteinfamilie hat. Sie bindet ebenfalls an das ADF-Protein, nicht aber an Cofilin2. Die Aminosäuresequenzen von murinem Cofilin1 und ADF weisen eine Übereinstimmung von 70 % auf ((VARTIAINEN et al., 2002); eigene Untersuchungen mittels *NCBI Protein BLAST*), die in Aktin bindenden Region lokalisiert ist, sodass das potentielle Cofilin1-Aptamer vermutlich in diesem identischen Bereich an die beiden Proteine bindet.

Zur Untersuchung der Fähigkeit des Cofilin1-Aptamers, die Aktivität von Cofilin1 im Hinblick auf Aktin zu modifizieren, wurden verschiedene Aktin-Assays durchgeführt. Zunächst wurde mit Hilfe des Aktin-*Pelleting*-Assays der Einfluss des Cofilin1-Aptamers auf die Fähigkeit von Cofilin1 an Aktin zu binden, untersucht. In diesem Assay werden durch Ultrazentrifugation G- und F-Aktin voneinander getrennt, sodass sich letztendlich das G-Aktin im Überstand und das F-Aktin im Pellet befindet (BROWN et al., 1982). Aufgrund seiner überwiegend F-Aktin depolymerisierenden Aktivität würde man das Cofilin1 in der Pelletfraktion erwarten, wie bereits schon in Abschnitt 5.1 bestätigt werden konnte. Die Ergebnisse dieses Assays zeigen, dass das Cofilin1-Aptamer spezifisch an das Cofilin1-Protein bindet und dafür sorgt, dass es bei der Zentrifugation pelletiert wird. Dies geschieht allerdings unabhängig von Aktin. Der Einfluss des Aptamers auf das Cofilin1 könnte offenbar darin zu bestehen, dass es für eine Aggregatbildung von Cofilin1-Proteinen sorgt und es somit pelletiert wird. Vielleicht ist die Aptamer-Sequenz dazu befähigt, gleichzeitig mehrere Cofilin1-Moleküle zu binden, sodass

sich Aggregate bilden können. Die Bindung des Aptamers könnte zu einer Konformationsänderung im Cofilin1-Molekül und darüber zu einer Oligomerisierung führen. Nachdem im *Pelleting*-Assay gezeigt werden konnte, dass die Bindung des Aptamers an Cofilin1 keine Auswirkungen auf dessen Fähigkeit hat an Aktin zu binden, wurde im *Falling-Ball*-Assay weiterhin der Einfluss des Cofilin1-Aptamers auf die Fähigkeit des Cofilin1-Proteins die Aktinpolymerisation zu beeinflussen, untersucht. Bei diesem Assay wird die Änderung der Viskosität einer Lösung bestimmt, die sich in Abhängigkeit zum Polymerisationsgrad des Aktins verändert. Dies erfolgt über die Ermittlung der Fallzeit, die eine Kugel für das Zurücklegen einer definierten Strecke benötigt. (MACLEAN-FLETCHER, POLLARD, 1980) Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl das Cofilin1-Aptamer als auch ein Cofilin1-unspezifisches Kontrollaptamer bereits einen Einfluss auf Aktin haben und die Polymerisation begünstigen. Dies ist vermutlich auf die Polarität der Aptamersequenzen zurückzuführen. Es könnte sein, dass durch die starke negative Ladung der Aptamere die Aktinpolymerisation gefördert wird. Das Cofilin1-Protein mit jeweils den beiden Aptamersequenzen zusammen erhöhen die Aktinpolymerisation noch stärker, da sich vermutlich der Einfluss des Cofilin1-Proteins und der Aptamersequenzen auf das Aktin addieren. Das Cofilin1-Aptamer scheint keinen spezifischen Effekt auf die Aktin depolymerisierende Aktivität von Cofilin1 zu haben, da sowohl das Cofilin1-Aptamer als auch die Kontrollsequenz allein schon für eine Erhöhung der Aktinpolymerisation sorgen.

Bei den durchgeführten Assays muss wiederum berücksichtigt werden, dass die Bedingungen so gewählt wurden, dass sie für die Aktinpolymerisation und für die Cofilin1-Aktivität optimal sind. Die Bedingungen, unter denen eine erfolgreiche Bindung des Cofilin1-Aptamers an das Cofilin1-Protein etabliert wurden, weichen davon ab. In den Assays lag der pH-Wert mit 7,0 etwas unter dem der SELEX, bei der er bei 7,4 lag. Die Bindung des Aptamers erfolgte im Assay bei RT anstatt bei 37°C wie bei der SELEX. Darüber hinaus enthielt der Polymerisationspuffer im Assay nur 2 mM  $\text{MgCl}_2$  statt 3 mM  $\text{MgCl}_2$  wie bei der Selektion, und zusätzlich 50 mM KCl. Weiterhin war der Polymerisationspuffer im Assay mit HEPES und PIPES gepuffert und enthielt darüber hinaus DTT, während bei der SELEX PBS als Puffer diente. Bei der Suche eines Aptamers gegen die Kinase Erk2 zeigte sich ebenfalls das Problem, dass die Bindung des Erk2-Aptamers sehr stark in Abhängigkeit der  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration und der Puffersubstanz steht. In PBS war die Bindung unabhängig von der  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration konstant, während in HEPES die Anwesenheit von  $\text{MgCl}_2$  die Bindung

sehr stark beeinflussen konnte. (LENNARZ et al., 2015) Somit liegt nahe, dass die Bindungseigenschaften des Cofilin1-Aptamers sehr stark von den gewählten Pufferbedingungen abhängen. Um die Frage des Einflusses des Assay-Polymerisationspuffers auf die Fähigkeit des Aptamers an Cofilin1 zu binden, zu klären, bietet sich ein Filterbindungsassay unter Aktin-Assay-Bedingungen an. Im Aktin-*Pelleting*-Assay konnte zwar eine Bindung des Cofilin1-Aptamers an Cofilin1-Protein gezeigt werden. Um aber die Ergebnisse weiterführender Untersuchungen richtig beurteilen zu können, muss zuvor diese Bindung genau charakterisiert werden.

Nach Klärung dieser Frage könnte in zukünftigen Studien die Auswirkungen des Cofilin1-Aptamers auf die Aktivität des Cofilin1-Proteins gegenüber Aktin und auch der Einfluss des Aptamers auf die Aktinpolymerisation noch genauer untersucht werden. Dazu könnte die TIRF (engl. *Total Internal Reflection Fluorescence*)-Mikroskopie angewendet werden, bei welcher man einzelne Aktinfilamente und somit auch die Auswirkungen von Proteinen oder auch der Aptamersequenzen auf das Filament direkt beobachten kann (KUHN, POLLARD, 2005). Im Anschluss daran muss geklärt, wie sich das Cofilin1-Aptamer in Zellen verhält. Zur Klärung der Frage, ob das Aptamer gegebenenfalls auch an andere zelluläre Proteine bindet, könnte ein *Pulldown*-Assay durchgeführt werden. Hierzu würde das Aptamer an eine feste Phase immobilisiert, diese in eine Säule gefüllt und natives Zelllysate darauf gegeben. Nach anschließender Abspaltung der bindenden Proteine und Westernblot-Analyse könnte man diese charakterisieren. Final kann dann das Aptamer in Zellen eingebracht werden, um dessen Auswirkung auf zellulärer Ebene zu analysieren. Dazu könnte das Cofilin1-Aptamer entweder über Lipofektion in die Zellen transfiziert oder direkt in den Zellen exprimiert werden.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass eine Aptamersequenz gefunden werden konnte, die an das Cofilin1-Protein bindet, welche aber auch eine vergleichbare Affinität für das ADF-Protein besitzt. Die zusätzliche Affinität für das ADF ist bei einer Anwendung des Cofilin1-Aptamers in T-Zellen irrelevant, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Cofilin1 das einzige Mitglied der ADF/Cofilin-Proteinfamilie ist, das in diesen Zellen exprimiert wird (vgl. Abschnitt 5).

## 6. Literatur

- ABRAHAM, R. T., A. WEISS, 2004: Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature reviews. Immunology* **4** (4), 301–308.
- ALBERTS, B., 2011: *Molekularbiologie der Zelle*, 5. Auflage. Weinheim, Wiley-VCH, LXII, 1801 S.
- AMBACH, A., J. SAUNUS, M. KONSTANDIN, S. WESSELBORG, S. C. MEUER, Y. SAMSTAG, 2000: The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *European journal of immunology* **30** (12), 3422–3431.
- ANDRIANANTOANDRO, E., T. D. POLLARD, 2006: Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Molecular cell* **24** (1), 13–23.
- ANGUS, K. L., G. M. GRIFFITHS, 2013: Cell polarisation and the immunological synapse. *Current opinion in cell biology* **25** (1), 85–91.
- ARBER, S., F. A. BARBAYANNIS, H. HANSER, C. SCHNEIDER, C. A. STANYON, O. BERNARD, P. CARONI, 1998: Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393** (6687), 805–809.
- ASCHMANN, M., 2010: *In vitro Studies of Actin Dynamics*. Projektarbeit. Universität Bonn, Institut für Genetik.
- AYSCOUGH, K. R., 1998: In vivo functions of actin-binding proteins. *Current opinion in cell biology* **10** (1), 102–111.
- BABBITT, B. P., P. M. ALLEN, G. MATSUEDA, E. HABER, E. R. UNANUE, 2005: Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. 1985. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **175** (7), 4163–4165.
- BADEA, T. C., Y. WANG, J. NATHANS, 2003: A noninvasive genetic/pharmacologic strategy for visualizing cell morphology and clonal relationships in the mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23** (6), 2314–2322.
- BAMBURG, J. R., H. E. HARRIS, A. G. WEEDS, 1980: Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS letters* **121** (1), 178–182.
- BAMBURG, J. R., 1999: Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* **15**, 185–230.
- BELLENCHI, G. C., C. B. GURNIAK, E. PERLAS, S. MIDDEI, M. AMMASSARI-TEULE, W. WITKE, 2007: N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes & development* **21** (18), 2347–2357.

- BERNSTEIN, B. W., J. R. BAMBURG, 2010: ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends in cell biology* **20** (4), 187–195.
- BIANCHINI, M., M. RADRIZZANI, M. G. BROCARD, G. B. REYES, C. GONZALEZ SOLVEYRA, T. A. SANTA-COLOMA, 2001: Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein. *Journal of immunological methods* **252** (1-2), 191–197.
- BILLADEAU, D. D., J. K. BURKHARDT, 2006: Regulation of cytoskeletal dynamics at the immune synapse: new stars join the actin troupe. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **7** (11), 1451–1460.
- BLANCHON, L., T. D. POLLARD, 1999: Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *The Journal of biological chemistry* **274** (22), 15538–15546.
- BLANCHON, L., R. C. ROBINSON, S. CHOE, T. D. POLLARD, 2000: Phosphorylation of Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure. *Journal of molecular biology* **295** (2), 203–211.
- BLIKSTAD, I., F. MARKEY, L. CARLSSON, T. PERSSON, U. LINDBERG, 1978: Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts, using inhibition of deoxyribonuclease I. *Cell* **15** (3), 935–943.
- BRADFORD, M. M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254.
- BROWN, S. S., K. YAMAMOTO, J. A. SPUDICH, 1982: A 40,000-dalton protein from Dictyostelium discoideum affects assembly properties of actin in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *The Journal of cell biology* **93** (1), 205–210.
- BUTCHER, E. C., L. J. PICKER, 1996: Lymphocyte homing and homeostasis. *Science (New York, N.Y.)* **272** (5258), 60–66.
- CAMPBELL, N. A., J. B. REECE, 2006: *Biologie*, 6. Auflage. München [u.a.], Pearson Studium, XLVI, 1606 S.
- CAO, W., J. P. GOODARZI, DE LA CRUZ, ENRIQUE M, 2006: Energetics and kinetics of cooperative cofilin-actin filament interactions. *Journal of molecular biology* **361** (2), 257–267.
- CARLIER, M. F., V. LAURENT, J. SANTOLINI, R. MELKI, D. DIDRY, G. X. XIA, Y. HONG, N. H. CHUA, D. PANTALONI, 1997: Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament

- turnover: implication in actin-based motility. *The Journal of cell biology* **136** (6), 1307–1322.
- CARRAWAY, K. L., CARRAWAY, C. A. C., ©1992: *The Cytoskeleton. A practical approach*. Oxford, New York, IRL Press at Oxford University Press, xviii, 268.
- CHUA, B. T., C. VOLBRACHT, K. O. TAN, R. LI, V. C. YU, P. LI, 2003: Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nature cell biology* **5** (12), 1083–1089.
- CLARKE, S. R., M. BARNDEN, C. KURTS, F. R. CARBONE, J. F. MILLER, W. R. HEATH, 2000: Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunology and cell biology* **78** (2), 110–117.
- COOPER, J. A., S. B. WALKER, T. D. POLLARD, 1983: Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *Journal of muscle research and cell motility* **4** (2), 253–262.
- COWAN, J. E., W. E. JENKINSON, G. ANDERSON, 2015: Thymus medulla fosters generation of natural Treg cells, invariant  $\gamma\delta$  T cells, and invariant NKT cells: What we learn from intrathymic migration. *European journal of immunology*.
- CRISPE, I. N., M. J. BEVAN, 1987: Expression and functional significance of the J11d marker on mouse thymocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) **138** (7), 2013–2018.
- CYSTER, J. G., 2005: Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annual review of immunology* **23**, 127–159.
- DUSTIN, M. L., S. K. BROMLEY, Z. KAN, D. A. PETERSON, E. R. UNANUE, 1997: Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (8), 3909–3913.
- DUSTIN, M. L., J. A. COOPER, 2000: The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nature immunology* **1** (1), 23–29.
- EIBERT, S. M., K.-H. LEE, R. PIPKORN, U. SESTER, G. H. WABNITZ, T. GIESE, S. C. MEUER, Y. SAMSTAG, 2004: Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (7), 1957–1962.
- ELAM, W. A., H. KANG, DE LA CRUZ, ENRIQUE M, 2013: Biophysics of actin filament severing by cofilin. *FEBS letters* **587** (8), 1215–1219.
- ELLINGTON, A. D., J. W. SZOSTAK, 1990: In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346** (6287), 818–822.

- EWINGER, M., 2012: Biochemical Comparison of n-Cofilin Point Mutants. Bachelorarbeit. Universität Bonn, Institut für Genetik.
- FALLON, R. F., D. A. GOODENOUGH, 1981: Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *The Journal of cell biology* **90** (2), 521–526.
- FAMULOK, M., M. BLIND, G. MAYER, 2001: Intramers as promising new tools in functional proteomics. *Chemistry & biology* **8** (10), 931–939.
- FAROUDI, M., M. HONS, A. ZACHACZ, C. DUMONT, R. LYCK, J. V. STEIN, TYBULEWICZ, VICTOR LJ, 2010: Critical roles for Rac GTPases in T-cell migration to and within lymph nodes. *Blood* **116** (25), 5536–5547.
- FEIL, R., 2007: Conditional somatic mutagenesis in the mouse using site-specific recombinases. *Handbook of experimental pharmacology* (178), 3–28.
- FINK, P. J., D. W. HENDRICKS, 2011: Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. *Nature reviews. Immunology* **11** (8), 544–549.
- FINK, P. J., 2013: The biology of recent thymic emigrants. *Annual review of immunology* **31**, 31–50.
- FIRE, A., S. XU, M. K. MONTGOMERY, S. A. KOSTAS, S. E. DRIVER, C. C. MELLO, 1998: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391** (6669), 806–811.
- FRAUWIRTH, K. A., C. B. THOMPSON, 2002: Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *The Journal of clinical investigation* **109** (3), 295–299.
- GARRELS, J. I., W. GIBSON, 1976: Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell* **9** (4 PT 2), 793–805.
- GODFREY, D. I., J. KENNEDY, T. SUDA, A. ZLOTNIK, 1993: A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) **150** (10), 4244–4252.
- GOHLA, A., J. BIRKENFELD, G. M. BOKOCH, 2005: Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nature cell biology* **7** (1), 21–29.
- GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J., M. I. FURMAN, D. WACHSSTOCK, D. SAFER, V. T. NACHMIAS, T. D. POLLARD, 1992: The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin.



- A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Molecular biology of the cell* **3** (9), 1015–1024.
- GORBATYUK, V. Y., N. J. NOSWORTHY, S. A. ROBSON, BAINS, NARESH P S, M. W. MACIEJEWSKI, DOS REMEDIOS, CRIS G, G. F. KING, 2006: Mapping the phosphoinositide-binding site on chick cofilin explains how PIP2 regulates the cofilin-actin interaction. *Molecular cell* **24** (4), 511–522.
- GRAGOUDAS, E. S., A. P. ADAMIS, E. T. CUNNINGHAM, M. FEINSOD, D. R. GUYER, 2004: Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **351** (27), 2805–2816.
- GRAKOUI, A., S. K. BROMLEY, C. SUMEN, M. M. DAVIS, A. S. SHAW, P. M. ALLEN, M. L. DUSTIN, 1999: The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* (New York, N.Y.) **285** (5425), 221–227.
- GURNIAC, C. B., F. CHEVESSIER, M. JOKWITZ, F. JÖNSSON, E. PERLAS, H. RICHTER, G. MATERN, P. P. BOYL, C. CHAPONNIER, D. FÜRST, R. SCHRÖDER, W. WITKE, 2014: Severe protein aggregate myopathy in a knockout mouse model points to an essential role of cofilin2 in sarcomeric actin exchange and muscle maintenance. *European journal of cell biology* **93** (5-6), 252–266.
- GURNIAC, C. B., E. PERLAS, W. WITKE, 2005: The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Developmental biology* **278** (1), 231–241.
- HARDER, T., K. SIMONS, 1999: Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. *European journal of immunology* **29** (2), 556–562.
- HERMANN, T., D. J. PATEL, 2000: Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* (New York, N.Y.) **287** (5454), 820–825.
- HIGGS, H., 2011: Summerschool on Actin Dynamics, Regensburg. Skript. Dartmouth Medical School, USA.
- HUPPA, J. B., M. M. DAVIS, 2003: T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature reviews. Immunology* **3** (12), 973–983.
- IKEDA, S., L. A. CUNNINGHAM, D. BOGGESS, N. HAWES, C. D. HOBSON, J. P. SUNDBERG, J. K. NAGGERT, R. S. SMITH, P. M. NISHINA, 2003: Aberrant actin cytoskeleton leads to accelerated proliferation of corneal epithelial cells in mice deficient for destrin (actin depolymerizing factor). *Human molecular genetics* **12** (9), 1029–1037.

- INDRA, A. K., X. WAROT, J. BROCARD, J. M. BORNERT, J. H. XIAO, P. CHAMBON, D. METZGER, 1999: Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic acids research* **27** (22), 4324–4327.
- JINEK, M., K. CHYLINSKI, I. FONFARA, M. HAUER, J. A. DOUDNA, E. CHARPENTIER, 2012: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)* **337** (6096), 816–821.
- KA, D., D. KIM, G. BAEK, E. BAE, 2014: Structural and functional characterization of *Streptococcus pyogenes* Cas2 protein under different pH conditions. *Biochemical and biophysical research communications* **451** (1), 152–157.
- KEEFE, A. D., S. PAI, A. ELLINGTON, 2010: Aptamers as therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery* **9** (7), 537–550.
- KLEMKE, M., E. KRAMER, M. H. KONSTANDIN, G. H. WABNITZ, Y. SAMSTAG, 2010: An MEK-cofilin signalling module controls migration of human T cells in 3D but not 2D environments. *The EMBO journal* **29** (17), 2915–2929.
- KLEMKE, M., G. H. WABNITZ, F. FUNKE, B. FUNK, H. KIRCHGESSNER, Y. SAMSTAG, 2008: Oxidation of cofilin mediates T cell hyporesponsiveness under oxidative stress conditions. *Immunity* **29** (3), 404–413.
- KUHN, J. R., T. D. POLLARD, 2005: Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophysical journal* **88** (2), 1387–1402.
- KWIATKOWSKI, D. J., 1999: Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Current opinion in cell biology* **11** (1), 103–108.
- LAIRD, P. W., A. ZIJDERVELD, K. LINDERS, M. A. RUDNICKI, R. JAENISCH, A. BERNIS, 1991: Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic acids research* **19** (15), 4293.
- LAMBRECHTS, A., M. VAN TROYS, C. AMPE, 2004: The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36** (10), 1890–1909.
- LAPPALAINEN, P., M. M. KESSELS, M. J. COPE, D. G. DRUBIN, 1998: The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Molecular biology of the cell* **9** (8), 1951–1959.

- LEE, K. H., S. C. MEUER, Y. SAMSTAG, 2000: Cofilin: a missing link between T cell co-stimulation and rearrangement of the actin cytoskeleton. *European journal of immunology* **30** (3), 892–899.
- LENNARZ, S., E. HEIDER, M. BLIND, G. MAYER, 2015: An Aptamer to the MAP Kinase Insert Region. *ACS chemical biology* **10** (1), 320–327.
- LEWANDOSKI, M., 2001: Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature reviews. Genetics* **2** (10), 743–755.
- LI, R., J. SOOSAIRAJAH, D. HARARI, A. CITRI, J. PRICE, H. L. NG, C. J. MORTON, M. W. PARKER, Y. YARDEN, O. BERNARD, 2006: Hsp90 increases LIM kinase activity by promoting its homo-dimerization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20** (8), 1218–1220.
- LIN, Y., S. D. JAYASENA, 1997: Inhibition of multiple thermostable DNA polymerases by a heterodimeric aptamer. *Journal of molecular biology* **271** (1), 100–111.
- LIU, J., G. D. STORMO, 2005: Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein-DNA interactions. *Nucleic acids research* **33** (17), e141.
- LODISH, H. F., 2008: *Molecular cell biology*, 6. Auflage. New York, W.H. Freeman, 1 v. (various.
- MACLEAN-FLETCHER, S. D., T. D. POLLARD, 1980: Viscometric analysis of the gelation of *Acanthamoeba* extracts and purification of two gelation factors. *The Journal of cell biology* **85** (2), 414–428.
- MAIER, T., M. GÜELL, L. SERRANO, 2009: Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS letters* **583** (24), 3966–3973.
- MCGOUGH, A., W. CHIU, 1999: ADF/cofilin weakens lateral contacts in the actin filament. *Journal of molecular biology* **291** (3), 513–519.
- MCGOUGH, A., B. POPE, W. CHIU, A. WEEDS, 1997: Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *The Journal of cell biology* **138** (4), 771–781.
- MIZUNO, K., 2013: Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cellular signalling* **25** (2), 457–469.
- MONKS, C. R., B. A. FREIBERG, H. KUPFER, N. SCIAKY, A. KUPFER, 1998: Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395** (6697), 82–86.

- MORIYAMA, K., K. IIDA, I. YAHARA, 1996: Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **1** (1), 73–86.
- MORIYAMA, K., I. YAHARA, 1999: Two activities of cofilin, severing and accelerating directional depolymerization of actin filaments, are affected differentially by mutations around the actin-binding helix. *The EMBO journal* **18** (23), 6752–6761.
- MORTON, W. M., K. R. AYSCOUGH, P. J. MCLAUGHLIN, 2000: Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nature cell biology* **2** (6), 376–378.
- MULLINS, R. D., J. A. HEUSER, T. D. POLLARD, 1998: The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** (11), 6181–6186.
- MULLIS, K. B., F. A. FALOONA, 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335–350.
- MURPHY, K. M., P. TRAVERS, M. WALPORT, 2014: *Janeway Immunologie*, 7. Auflage. Berlin, Springer Berlin, XXVI, 1094 S. in 1 Teil.
- MUSSOLINO, C., R. MORBITZER, F. LÜTGE, N. DANNEMANN, T. LAHAYE, T. CATHOMEN, 2011: A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic acids research* **39** (21), 9283–9293.
- NAGAOKA, R., H. ABE, T. OBINATA, 1996: Site-directed mutagenesis of the phosphorylation site of cofilin: its role in cofilin-actin interaction and cytoplasmic localization. *Cell motility and the cytoskeleton* **35** (3), 200–209.
- NAGY, A., 2000: Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **26** (2), 99–109.
- NEBL, G., S. FISCHER, R. PENZEL, Y. SAMSTAG, 2004: Dephosphorylation of cofilin is regulated through Ras and requires the combined activities of the Ras-effectors MEK and PI3K. *Cellular signalling* **16** (2), 235–243.
- NEBL, G., S. C. MEUER, Y. SAMSTAG, 1996: Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *The Journal of biological chemistry* **271** (42), 26276–26280.
- NEUMANN, J., 2008: *Immunbiologie. Eine Einführung*. Berlin, Heidelberg, Springer, x, 286 S.

- NISHIDA, E., S. MAEKAWA, H. SAKAI, 1984: Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry* **23** (22), 5307–5313.
- NISHITA, M., C. TOMIZAWA, M. YAMAMOTO, Y. HORITA, K. OHASHI, K. MIZUNO, 2005: Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *The Journal of cell biology* **171** (2), 349–359.
- NIWA, R., K. NAGATA-OHASHI, M. TAKEICHI, K. MIZUNO, T. UEMURA, 2002: Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* **108** (2), 233–246.
- OHTA, Y., K. KUSAKA, K. NAGATA-OHASHI, K. OHASHI, A. MURAMOTO, Y. SHIMA, R. NIWA, T. UEMURA, K. MIZUNO, 2003: Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **8** (10), 811–824.
- OTTERBEIN, L. R., P. GRACEFFA, R. DOMINGUEZ, 2001: The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science (New York, N.Y.)* **293** (5530), 708–711.
- POLLARD, T. D., L. BLANCHON, R. D. MULLINS, 2000: Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **29**, 545–576.
- POLLARD, T. D., G. G. BORISY, 2003: Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112** (4), 453–465.
- POLLARD, T. D., J. A. COOPER, 2009: Actin, a central player in cell shape and movement. *Science (New York, N.Y.)* **326** (5957), 1208–1212.
- PRING, M., A. WEBER, M. R. BUBB, 1992: Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* **31** (6), 1827–1836.
- PRUYNE, D., M. EVANGELISTA, C. YANG, E. BI, S. ZIGMOND, A. BRETSCHER, C. BOONE, 2002: Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science (New York, N.Y.)* **297** (5581), 612–615.
- SAKATA, D., H. TANIGUCHI, S. YASUDA, A. ADACHI-MORISHIMA, Y. HAMAZAKI, R. NAKAYAMA, T. MIKI, N. MINATO, S. NARUMIYA, 2007: Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1. *The Journal of experimental medicine* **204** (9), 2031–2038.

- SALZ, A., 2011: Die Rolle von N-Cofilin in der T-Zellentwicklung. Diplomarbeit. Universität Bonn, Institut für Genetik.
- SAMSTAG, Y., E. M. DREIZLER, A. AMBACH, G. SCZAKIEL, S. C. MEUER, 1996: Inhibition of constitutive serine phosphatase activity in T lymphoma cells results in phosphorylation of pp19/cofilin and induces apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **156** (11), 4167–4173.
- SAMSTAG, Y., C. ECKERSKORN, S. WESSELBORG, S. HENNING, R. WALLICH, S. C. MEUER, 1994: Costimulatory signals for human T-cell activation induce nuclear translocation of pp19/cofilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91** (10), 4494–4498.
- SAMSTAG, Y., S. M. EIBERT, M. KLEMKE, G. H. WABNITZ, 2003: Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *Journal of leukocyte biology* **73** (1), 30–48.
- SAMSTAG, Y., I. JOHN, G. H. WABNITZ, 2013: Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration. *Immunological reviews* **256** (1), 30–47.
- SCHNEIDER, U., H. U. SCHWENK, G. BORNKAMM, 1977: Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **19** (5), 621–626.
- SCHOLZEN, T., J. GERDES, 2000: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* **182** (3), 311–322.
- SCHULTE, B., I. JOHN, B. SIMON, C. BROCKMANN, S. A. OELMEIER, B. JAHRAUS, H. KIRCHGESSNER, S. RIPLINGER, T. CARLOMAGNO, G. H. WABNITZ, Y. SAMSTAG, 2013: A reducing milieu renders cofilin insensitive to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) inhibition. *The Journal of biological chemistry* **288** (41), 29430–29439.
- SHIPKOVA, M., E. WIELAND, 2012: Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **413** (17-18), 1338–1349.
- SIMS, T. N., T. J. SOOS, H. S. XENIAS, B. DUBIN-THALER, J. M. HOFMAN, J. C. WAITE, T. O. CAMERON, V. K. THOMAS, R. VARMA, C. H. WIGGINS, M. P. SHEETZ, D. R. LITTMAN, M. L. DUSTIN, 2007: Opposing effects of PKC $\theta$  and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell* **129** (4), 773–785.

- SMITH, K. A., 1988: Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science (New York, N.Y.)* **240** (4856), 1169–1176.
- SOUTHERN, E. M., 1975: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* **98** (3), 503–517.
- SPUDICH, J. A., S. WATT, 1971: The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *The Journal of biological chemistry* **246** (15), 4866–4871.
- SRINIVAS, S., T. WATANABE, C. S. LIN, C. M. WILLIAM, Y. TANABE, T. M. JESSELL, F. COSTANTINI, 2001: Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC developmental biology* **1**, 4.
- STEIN, J. V., C. NOMBELA-ARRIETA, 2005: Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* **116** (1), 1–12.
- STERNBERG, N., D. HAMILTON, 1981: Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of molecular biology* **150** (4), 467–486.
- STOLP, B., M. REICHMAN-FRIED, L. ABRAHAM, X. PAN, S. I. GIESE, S. HANNEMANN, P. GOULIMARI, E. RAZ, R. GROSSE, O. T. FACKLER, 2009: HIV-1 Nef interferes with host cell motility by deregulation of Cofilin. *Cell host & microbe* **6** (2), 174–186.
- STOLTENBURG, R., C. REINEMANN, B. STREHLITZ, 2005: FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Analytical and bioanalytical chemistry* **383** (1), 83–91.
- STOLTENBURG, R., C. REINEMANN, B. STREHLITZ, 2007: SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular engineering* **24** (4), 381–403.
- SUMI, T., K. MATSUMOTO, Y. TAKAI, T. NAKAMURA, 1999: Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *The Journal of cell biology* **147** (7), 1519–1532.
- THEIS, M. G., A. KNORRE, B. KELLERSCH, J. MOELLEKEN, F. WIELAND, W. KOLANUS, M. FAMULOK, 2004: Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (31), 11221–11226.
- TIAN, Y., S. JAMES, J. ZUO, B. FRITZSCH, K. W. BEISEL, 2006: Conditional and inducible gene recombineering in the mouse inner ear. *Brain research* **1091** (1), 243–254.

- TORRES, A. J., R. L. CONTENTO, S. GORDO, K. W. WUCHERPFENNIG, J. C. LOVE, 2013: Functional single-cell analysis of T-cell activation by supported lipid bilayer-tethered ligands on arrays of nanowells. *Lab on a chip* **13** (1), 90–99.
- TOSHIMA, J., J. Y. TOSHIMA, T. AMANO, N. YANG, S. NARUMIYA, K. MIZUNO, 2001: Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Molecular biology of the cell* **12** (4), 1131–1145.
- TOSHIMA, J., J. Y. TOSHIMA, K. TAKEUCHI, R. MORI, K. MIZUNO, 2001: Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *The Journal of biological chemistry* **276** (33), 31449–31458.
- TOWBIN, H., T. STAHELIN, J. GORDON, 1979: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76** (9), 4350–4354.
- TUERK, C., L. GOLD, 1990: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* **249** (4968), 505–510.
- URNOV, F. D., J. C. MILLER, Y.-L. LEE, C. M. BEAUSEJOUR, J. M. ROCK, S. AUGUSTUS, A. C. JAMIESON, M. H. PORTEUS, P. D. GREGORY, M. C. HOLMES, 2005: Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435** (7042), 646–651.
- VARTIAINEN, M. K., T. MUSTONEN, P. K. MATTILA, P. J. OJALA, I. THESLEFF, J. PARTANEN, P. LAPPALAINEN, 2002: The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Molecular biology of the cell* **13** (1), 183–194.
- VERMES, I., C. HAANEN, H. STEFFENS-NAKKEN, C. REUTELINGSPERGER, 1995: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods* **184** (1), 39–51.
- VOLLER, A., A. BARTLETT, D. E. BIDWELL, 1978: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of clinical pathology* **31** (6), 507–520.
- WABNITZ, G. H., C. GOURSOT, B. JAHRAUS, H. KIRCHGESSNER, A. HELLWIG, M. KLEMKE, M. H. KONSTANDIN, Y. SAMSTAG, 2010: Mitochondrial translocation of oxidized cofilin induces

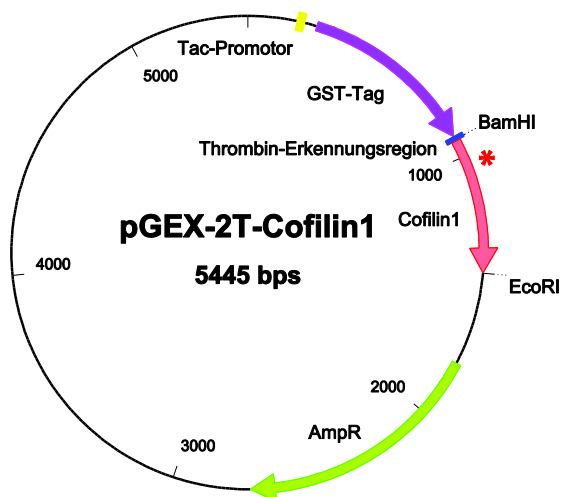


- caspase-independent necrotic-like programmed cell death of T cells. *Cell death & disease* **1**, e58.
- WABNITZ, G. H., G. NEBL, M. KLEMKE, A. J. SCHRÖDER, Y. SAMSTAG, 2006: Phosphatidylinositol 3-kinase functions as a Ras effector in the signaling cascade that regulates dephosphorylation of the actin-remodeling protein cofilin after costimulation of untransformed human T lymphocytes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) **176** (3), 1668–1674.
- WEISS, S., D. PROSKE, M. NEUMANN, M. H. GROSCHUP, H. A. KRETZSCHMAR, M. FAMULOK, E. L. WINNACKER, 1997: RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *Journal of virology* **71** (11), 8790–8797.
- WEN, X., L. DING, J.-J. WANG, M. QI, J. HAMMONDS, H. CHU, X. CHEN, E. HUNTER, P. SPEARMAN, 2014: ROCK1 and LIM kinase modulate retrovirus particle release and cell-cell transmission events. *Journal of virology* **88** (12), 6906–6921.
- WINDER, S. J., K. R. AYSCOUGH, 2005: Actin-binding proteins. *Journal of cell science* **118** (Pt 4), 651–654.
- WOLFER, A., T. BAKKER, A. WILSON, M. NICOLAS, V. IOANNIDIS, D. R. LITTMAN, P. P. LEE, C. B. WILSON, W. HELD, H. R. MACDONALD, F. RADTKE, 2001: Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nature immunology* **2** (3), 235–241.
- WU, Y., A. YODER, D. YU, W. WANG, J. LIU, T. BARRETT, D. WHEELER, K. SCHLAUCH, 2008: Cofilin activation in peripheral CD4 T cells of HIV-1 infected patients: a pilot study. *Retrovirology* **5**, 95.
- YAMASHITA, I., T. NAGATA, T. TADA, T. NAKAYAMA, 1993: CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *International immunology* **5** (9), 1139–1150.
- YANG, N., O. HIGUCHI, K. OHASHI, K. NAGATA, A. WADA, K. KANGAWA, E. NISHIDA, K. MIZUNO, 1998: Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393** (6687), 809–812.
- YODER, A., D. YU, L. DONG, S. R. IYER, X. XU, J. KELLY, J. LIU, W. WANG, P. J. VORSTER, L. AGULTO, D. A. STEPHANY, J. N. COOPER, J. W. MARSH, Y. WU, 2008: HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells. *Cell* **134** (5), 782–792.

- YONEZAWA, N., Y. HOMMA, I. YAHARA, H. SAKAI, E. NISHIDA, 1991: A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin. *The Journal of biological chemistry* **266** (26), 17218–17221.
- YONEZAWA, N., E. NISHIDA, H. SAKAI, 1985: pH control of actin polymerization by cofilin. *The Journal of biological chemistry* **260** (27), 14410–14412.
- YOO, Y., H. J. HO, C. WANG, J.-L. GUAN, 2010: Tyrosine phosphorylation of cofilin at Y68 by v-Src leads to its degradation through ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* **29** (2), 263–272.
- ZHANG, D. J., Q. WANG, J. WEI, G. BAIMUKANOVA, F. BUCHHOLZ, A. F. STEWART, X. MAO, N. KILLEEN, 2005: Selective expression of the Cre recombinase in late-stage thymocytes using the distal promoter of the Lck gene. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **174** (11), 6725–6731.
- ZIMMERLE, C. T., C. FRIEDEN, 1988: Effect of pH on the mechanism of actin polymerization. *Biochemistry* **27** (20), 7766–7772.
- ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C., 2004: T-cell development made simple. *Nature reviews. Immunology* **4** (1), 67–72.

## 7. Anhang

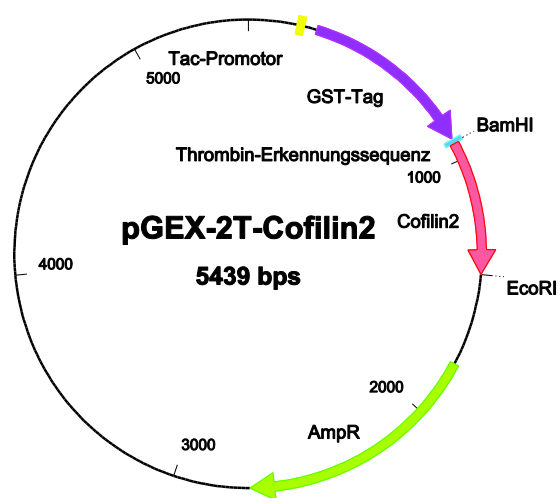
### 7.1. Vektorkarten



#### pGEX-2T-Cofilin1

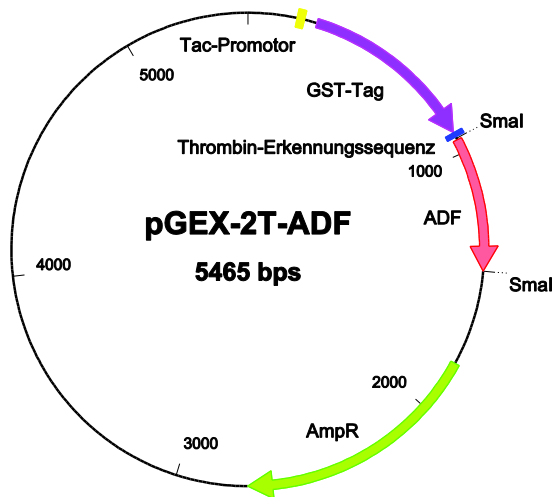
Expressionsvektor für das Fusionsprotein GST-Cofilin1, Cofilin1 wurde über *BamHI/EcoRI* kloniert, *GST-Tag* zur Aufreinigung, Thrombin-Erkennungssequenz zur Abspaltung des *Tags*, IPTG-induzierbarer Tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen (*AmpR*)

\* markiert die Stelle, an denen in den Vektoren pGEX-2T-Cofilin1-Ala und pGEX-2T-Cofilin1-Asp die Mutation im Serin3 eingefügt wurde



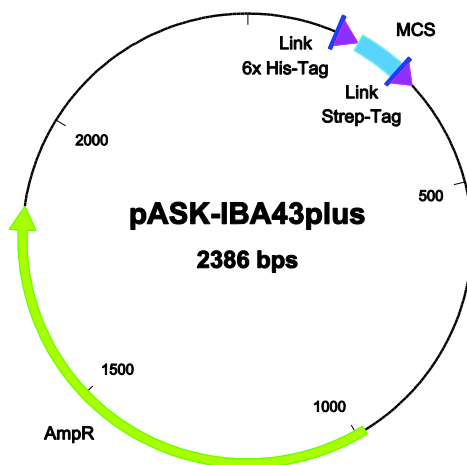
#### pGEX-2T-Cofilin2

Expressionsvektor für das Fusionsprotein GST-Cofilin2, Cofilin2 wurde über *BamHI/EcoRI* kloniert, *GST-Tag* zur Aufreinigung, Thrombin-Erkennungssequenz zur Abspaltung des *Tags*, IPTG-induzierbarer Tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen (*AmpR*)



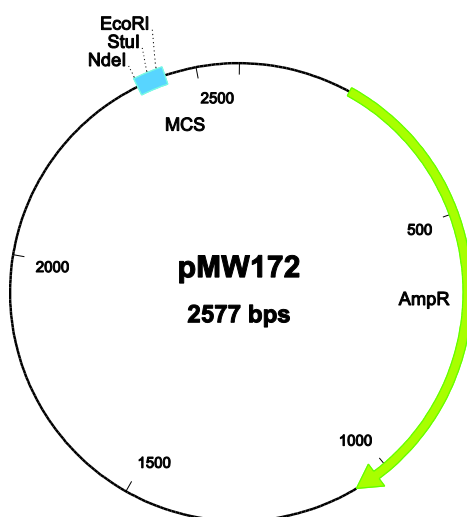
### pGEX-2T-ADF

Expressionsvektor für das Fusionsprotein GST-Cofilin2, Cofilin2 wurde über *Sma*/ *Sma* kloniert, *GST-Tag* zur Aufreinigung, Thrombin-Erkennungssequenz zur Abspaltung des *Tags*, IPTG-induzierbarer Tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen (*AmpR*)



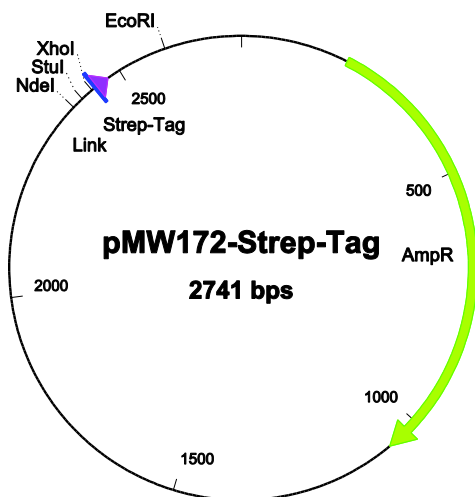
### pASK-IBA43plus

Expressionsvektor mit multipler Klonierungsstelle (MCS) zur Insertion von Proteinen, *Strep-Tag* II, 6x Histidin-*Tag* (6x His-*Tag*), Link kann das zu exprimierende Protein vom *Tag* abgrenzen, Ampizillin-Resistenzgen (*AmpR*)



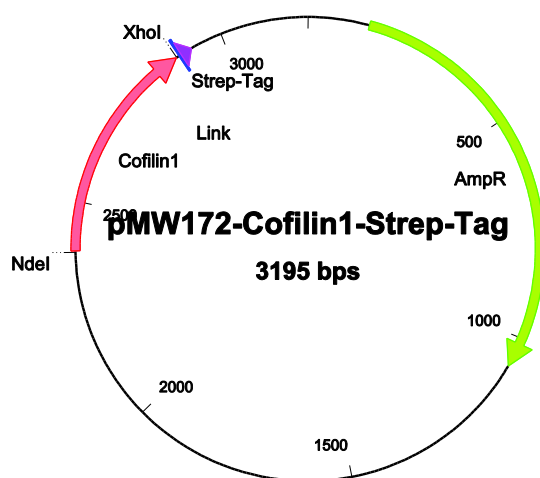
### pMW172

Vektor für die Expression von Aktinbindepoteinen, multiple Klonierungsstelle (MCS) zur Insertion von Proteinen, IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen (*AmpR*)



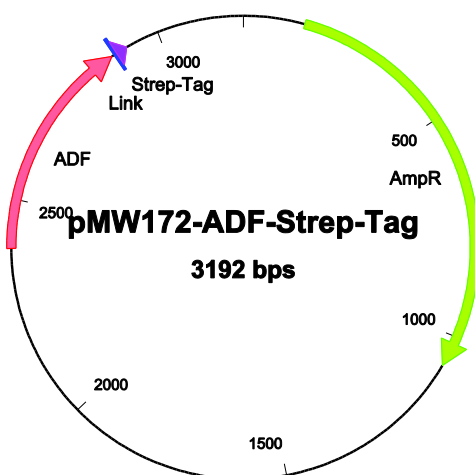
### pMW172-Strep-Tag

Vektor für die Expression von Aktinbindeproteinen, *Strep-Tag II* subkloniert aus dem Vektor pASK-IBA43plus über *SmaI/EcoRI*, IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen (AmpR)



### pMW172-Cofilin1-Strep-Tag

Expressionsvektor für das Fusionsprotein Cofilin1-Strep-Tag II, Cofilin1-cDNA subkloniert aus dem Vektor pGEX-T2-Cofilin1 über *NdeI/XhoI*, Link grenzt Cofilin1 vom *Tag* abgrenzen IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen (AmpR)



### pMW172-ADF-Strep-Tag

Expressionsvektor für das Fusionsprotein ADF-Strep-Tag II, ADF-cDNA subkloniert aus dem Vektor pGEX-T2-ADF mittels In-Fusion-Klonierung, Link grenzt ADF vom *Tag* abgrenzen IPTG-induzierbarer tac-Promotor, Ampizillin-Resistenzgen (AmpR)